Aus dem Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Bernhard Schmidt
und dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Experimentelle Untersuchungen zur Frage der antibakteriellen Prinzipien in Begonia semperflorens und Folia Uvae ursi

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Joachim Schütz
aus Berlin

1962

Aus dem Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Bernhard Schmidt
und dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Experimentelle Untersuchungen zur Frage der antibakteriellen Prinzipien in Begonia semperflorens und Folia Uvae ursi

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Joachim Schütz
aus Berlin

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Referent: Professor Dr. B. Schmidt
1. Koreferent: Professor Dr. R. Hänsel
2. Koreferent: Professor Dr. G. Schenck
Tag der mündlichen Prüfung: 17.5.1962

Tag der Promotion: 25. Juli 1962

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. B. Schmidt am Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie sowie unter Leitung von Herrn Professor Dr. R. Hänsel am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Hiermit möchte ich meinen verehrten Lehrern, Herrn Professor Dr. B. Schmidt und Herrn Professor Dr. R. Hänsel, für ihre Unterstützung und ihre theoretischen und praktischen Hinweise für diese Arbeit danken.

Weiteren Dank schulde ich Herrn Professor Dr. Brosig und Herrn Dr. Nagel von der Urologischen Abteilung des Westendkrankenhauses Berlin, die die Durchführung von in-vivo-Versuchen an Kranken ermöglichten, sowie Herrn Dr. Kolb vom Institut für Tierzucht und Erbpathologie der Freien Universität Berlin, der die Tierversuche übernahm.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	4
II. Methodik	8
III. Das antibakterielle Prinzip in Begonia semperflorens	
A. Untersuchungen anderer Autoren	11
B. Problemstellung	12
C. Eigene Untersuchungen	
1. Extraktion	13
2. Identifizierung	15
a) Chemische Methode	16
b) Papierchromatographische Methode	17
IV. Das antibakterielle Prinzip in den Folia Uvae ursi	18
A. Allgemeines	19
B. Botanik	21
C. Inhaltsstoffe	23
D. Theorie der Wirkungsweise des Bärentraubenblättertees	24
E. Problemstellung	25
F. Eigene Untersuchungen	
1. Antibakterielle Wirkung in vitro	28
2. Darstellung von Arbutin	29
3. Prüfung von Arbutin auf bakteriostatische Wirkung	31
4. Extraktion	32
5. Papierchromatographische Untersuchungen	37
6. Säulenchromatographische Untersuchungen	42
7. Eluataufarbeitung	
a) Lösungs- und Reinigungsversuche	46
b) Sublimation	49
8. Identifizierung des Sublimats	50
9. Identifizierung des genuinen in vitro antibakteriellen Prinzips	51

Seite

10. Nachweis der bakteriostatisch wirksamen Substanz nach Körperpassage 54

a) Tierversuche 54

b) Selbstversuch 55

11. Nachweis der in vitro bakteriostatischen Substanz aus den Folia Uvae ursi nach Körperpassage im Selbstversuch

a) qualitative Bestimmung 56

b) quantitative Bestimmung 57

12. Quantitative Bestimmung der wirksamen Substanz in den Folia Uvae ursi

a) Methode 58

b) Experimenteller Nachweis 59

13. Nachweis der Wirksamkeit der Gallussäure auf verschiedene Keime 67

14. Untersuchungen der Wirksamkeit der Folia Uvae ursi am kranken menschlichen Organismus 71

G. Diskussion 74

V. Zusammenfassung 80

VI. Literaturverzeichnis 82

I. Einleitung

In der Volksmedizin werden seit langen Zeiten, wahrscheinlich seit Beginn der Menschheitsgeschichte, Pflanzen zur Bekämpfung von Krankheiten verwendet.

Im Laufe der Zeit haben sich rein empirisch bestimmte Auffassungen über die Wirksamkeit und Anwendung solcher Pflanzen bei den verschiedenen Krankheiten herausgebildet, die von Generation zu Generation übernommen wurden. Dabei kam es weniger auf das "Warum" als auf die Tatsache der Wirkung an.

Die Entwicklung der exakten Naturwissenschaften führte u.a. zur Erforschung der therapeutisch wirksamen Inhaltsstoffe dieser "Arzneipflanzen".

Die Untersuchungen konnten einmal von der in vivo festgestellten Wirkung ausgehen, zum anderen konnten aber auch in der Heilkunde unbekannte Pflanzen auf ihre Inhaltsstoffe untersucht und die isolierten Substanzen dann pharmakologisch getestet werden.

Seit den Erfolgen Flemings, dem ein entscheidender Sieg über virulente Mikroben im menschlichen Organismus mit Hilfe des Penicillins gelang, trat ein spezieller Zweig der Phytochemie in den Vordergrund, der sich besonders mit höheren und niederen Pflanzen beschäftigte, die entweder von altersher bei inneren oder äusseren Erkrankungen als Folge bakterieller Infektionen mit angeblichem Erfolg verwendet worden waren, bzw. der sich mit einer allgemeinen Prüfung von Pflanzenextrakten auf ihre wachstumshemmende Wirkung gegenüber Mikroorganismen befasste. Die Anzahl der besonders auf dem letzten Gebiet durchgeführten Untersuchungen stieg innerhalb kurzer Zeit schnell an. Im Laufe weniger Jahre wurden viele Tausende von Pflanzen auf ihre bakterizide und bakteriostatische Wirksamkeit getestet.

Auf dem Gebiet der vergleichenden Untersuchungen von Pflanzen auf ihre keimtötenden Eigenschaften trat zuerst Osborn[1] im Jahre 1943 mit einer Prüfung von 2300 Arten hervor; viele andere, z.B. Atkinson[2], Freerksen[3], Nishikawa[4], Agostimucci[5], Tanabe[6] und Frishbey[7] folgten. In Deutschland haben sich besonders Winter und Mitarbeiter[8] mit diesem Thema beschäftigt.

Die Zahl der veröffentlichten Einzelarbeiten über Pflanzeninhaltsstoffe, die ein Bakterienwachstum verhindern, ist inzwischen so gross geworden, dass in diesem Rahmen Literaturhinweise bewusst unterlassen wurden. Es seien nur die Zusammenfassungen auf diesem Gebiet von Duquenois[9], Skinner[10] und Korzybski und Kurylowicz[11] erwähnt, von denen die letzteren auch eine sehr schöne Übersicht über die jeweiligen Extraktionsmethoden der betreffenden aktiven Inhaltsstoffe geben.

Eine einheitliche Definition der Stoffe, die aus höheren Pflanzen isoliert wurden und die ein Wachstum von niederen Organismen hemmten, ist bis heute noch nicht erfolgt. Während die Tatsache, dass u.U. auf ein und demselben Nährboden zwei Mikroorganismen nicht nebeneinander existieren können, schon von Pasteur erkannt und von Ward als "Antibiose" bezeichnet wurde[12], gebrauchte Fleming für sein Penicillin das 1889 gebildete Wort "Antibioticum"[13].

Von den meisten Autoren wird dieser Begriff für die aus höheren Pflanzen isolierten wachstumshemmenden Substanzen abgelehnt. Sie bezeichnen als Voraussetzung für den Begriff "Antibioticum"

1) die Bildung des betreffenden Stoffes von Mikroorganismen[14],
2) eine grosse Wirkung bei geringer Konzentration der Substanz[15],

3) eine minimale oder überhaupt keine Toxizität[16],
4) die Beschränkung der Wirksamkeit auf Bakterien, Fungi oder Protozoen,
5) ein relativ hohes Molekulargewicht des betreffenden Stoffes.

Die aus höheren Pflanzen isolierten Substanzen erfüllen mehr oder weniger alle dieser Voraussetzungen bis auf Punkt 1. Dass zumindest das Festhalten an diesem Punkt, der die Bildung des betreffenden Stoffes von lebenden Mikroorganismen verlangt, überholt ist, beweist die Tatsache, dass verschiedene der natürlich produzierten Substanzen, z.B. das Chloramphenicol, heute auf technischem Wege gewonnen werden, ohne dass Bedenken dagegen erhoben würden, diese Stoffe als "Antibiotika" zu deklarieren.

Vonderbank und Erdmann[17] haben auch diesen Punkt berücksichtigt und definieren ein Antibiotikum als

> "eine ursprünglich von lebenden Zellen gebildete und erstmalig aus diesen oder ihren Stoffwechselprodukten isolierte einheitliche, chemisch definierte, reproduzierbare Substanz oder deren entweder durch chemische Veränderung oder auf biosynthetischem Weg erhaltenen Derivate mit hemmender, d.h. statischer, degenerativer, lytischer oder abtötender Wirkung gegen pflanzliche oder tierische Microorganismen wie etwa Viren, Bakterien, Rickettsien, Actinomyceten, Fungi, Algen oder Protozoen."

Nach dieser exakten Begriffsbestimmung wurden Versuche unternommen, die aus höheren Pflanzen isolierten Substanzen in eine Sondergruppe mit speziellem Namen einzuordnen. Besonders zu erwähnen sind die Begriffe der "Phytoantibiotika"[18] oder der "Phytonzide"[19]. Da eine endgültige und allgemein gebrauchte Definition z.Zt. aber noch aussteht, erschien es angebracht, im Rahmen dieser Arbeit nach Fleming von "antibakteriellen" Substanzen zu sprechen.

Pratt und Dufrenoy[15] haben die aus höheren Pflanzen isolierten antibakteriellen Stoffe nach ihrer chemischen Zusammensetzung unterteilt in

1) Schwefelverbindungen; z.B. Alliin (Allium cepa),
2) Glykoside; z.B. Tomatin (Lycopersicum),
3) ungesättigte Lactone; z.B. Anemonin (Ranunculaceae),
4) fette Säuren; z.B. Laurinsäure (Umbellularia californica),
5) Chinone und ihre Derivate; z.B. Juglon, Plumbagin (Juglans, Drosera).

Da die Zahl der bis jetzt durchgeführten Untersuchungen, die nur eine wachstumshemmende Wirkung der Pflanzen bzw. Pflanzenteile gegenüber Mikroorganismen generell feststellten, im Verhältnis zu der Anzahl der isolierten Inhaltsstoffe infolge der Einfachheit der Methode wesentlich umfangreicher ist, dürfte die vorstehende Einteilung noch nicht als endgültig anzusehen sein.

Die Tatsache, dass die fortschreitende Resistenz von Mikroorganismen gegenüber den Antibiotika zu einem Problem ersten Ranges geworden ist und deswegen laufend neue Mittel gegen bakterielle Infektionskrankheiten gesucht werden müssen, unterstreicht das Interesse an der Klärung der Frage, welches die eigentlichen antibakteriellen Prinzipien der in vitro positiven Versuche mit ganzen Pflanzen oder ihren Extrakten sind und inwieweit die isolierten Substanzen in der Medizin zur Therapie herangezogen werden können.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen auf diesem Gebiet.

II. Methodik

Es wurden Begonia semperflorens und Folia Uvae ursi auf ihre in vitro antibakteriellen Inhaltsstoffe untersucht. Als Ausgangsmaterial wurden in allen Fällen geschnittene Pflanzenteile verwendet. Die frischen Begonienblätter wurden nach einer maximalen Lagerzeit von drei Stunden seit dem Pflücken mit einem Schneide-Boy zerkleinert; der Bärentraubenblättertee wurde, soweit nicht anders erwähnt, durch den pharmazeutischen Grosshandel in bereits geschnittener bzw. pulverisierter Form bezogen.

Bei den mikrobiologischen Versuchen wurden Loch-, Verdünnungs- und Blättchenteste angewendet:

1) Lochtest. In die Mitte einer Agarplatte wurde mit einem Korkbohrer von 1,4 cm Ø ein Loch gestanzt, in das das zu prüfende durchfeuchtete Material mit einem Glasstab gepresst wurde. Mit einer Platinöse wurden darauf die Keime (Staph. aur.) auf der Platte bis genau an den Rand des Lochs ausgestrichen. Der Lochtest wurde nur in Verbindung mit Pflanzenmaterial und z.T. der Säulenchromatographie, bei der nicht eluierte Zonen ausgestossen und Proben davon in Löcher gedrückt wurden, durchgeführt.

2) Verdünnungstest. Von einer Bakterien-Kulturplatte wurde ein Abstrich gemacht und dieser in 5 ccm Nährbouillon überimpft. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C wurden 0,5 ccm der vorher umgeschüttelten Keimsuspension in ein Reagenzglas pipettiert und 4,5 ccm physiologische Kochsalzlösung hinzugegeben, was einer Verdünnung von 1:10 entspricht. Dieser Vorgang wurde so lange weitergeführt, bis eine Verdünnung von 1 : 100 000 erreicht war. Anschliessend wurden 0,1 ccm entnommen und auf eine vorher getrocknete Agarschale getropft. Mit einem Glasspatel wurde die Suspension so lange verrie-

ben, bis die Oberfläche der Agarschicht vollständig trocken war.
Die Verdünnung 1 : 100 000 galt nur für Versuche mit Staphylococcus aureus. Sie ergab nach der Ausspatelung und Bebrütung einen Bakterienrasen, der weder zu dick noch zu dünn war, so dass auch bei Proben mit geringerer Konzentration der antibakteriellen Wirkstoffe einwandfrei Höfe ermittelt werden konnten.

3) Blättchentest. Im Gegensatz zum Lochtest wurden bei diesen Versuchen die Agarplatten zuerst mit den entsprechenden Bouillon-Verdünnungen der einzelnen Keime beimpft (s. Verdünnungstest) und dann Rundfilterscheiben von 1,1 cm Durchmesser, die mit einem Extrakt oder einer Lösung der Wirkstoffe getränkt worden waren, auf die Platten gelegt. Bei den papierchromatographischen Untersuchungen wurden anstatt dieser Scheiben Flecken ausgeschnitten, mit einigen Tropfen Aqua dest. befeuchtet und ebenfalls auf die beimpften Platten gelegt.

Sämtliche beimpften Agarschalen wurden 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Der Durchmesser der entstandenen Höfe wurde in cm gemessen.

Testkeime: Da Micrococcus pyogenes var. aureus Stamm SG 511 Jena (im folgenden "Staph. aur." bezeichnet) gegenüber den antibakteriell wirkenden Inhaltsstoffen der untersuchten Pflanzen gut reagierte, wurde bei den Extraktions- und Isolierungsversuchen ausschliesslich dieser Stamm verwendet.

Bei der Untersuchung des Wirkungsspektrums des aus den Folia Uvae ursi isolierten in vitro antibakteriellen Wirkstoffes wurden folgende Keime aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität Berlin benutzt:

Proteus vulgaris,
Escherichia coli,
Aerobacter aerogenes,
Pseudomonas pyoceanea,
Klebsiella pneumoniae,
Streptococcus faecalis,
Micrococcus pyogenes var. aureus
(Staphylococcus aureus) Stamm SG 511 Jena,
dto. Stamm Berlin,
Micrococcus pyogenes var. albus,
Corynebacterium pseudodiphtheriticum,
Diplococcus pneumoniae,
Streptococcus pyogenes.

Die Stämme wurden nach Bergey's Manual[20] bezeichnet.

Nährböden: Zur Züchtung der Keime wurden folgende Nährböden verwendet:

1) Nähragar. Aus 500 g zerkleinertem Pferdefleisch und einem Liter Wasser wurde durch Kochen eine Fleischbrühe hergestellt. Nach dem Filtrieren wurden 3 g NaCl, 2 g Na_2HPO_4 nach Sörensen, 10 g Pepton, 20 g Agar-Agar und ca. 20 ccm n/1 NaOH zur Einstellung von einem pH = 7,4 zugesetzt. Anschliessend wurde eine halbe Stunde bei 120° C autoklaviert, der pH noch einmal gemessen und durch Zugabe von weiterem NaOH wiederum auf 7,4 gebracht und darauf der noch flüssige Nähragar in Petrischalen ausgegossen.

2) Blutagar. Der Blutagar wurde wie der Nähragar bereitet, jedoch wurde ihm nach dem Abkühlen auf 50° C 7 % defibriniertes Hammelblut zugegeben. Anschliessend wurde er dann in Petrischalen ausgegossen.

Zur quantitativen Keimzahlbestimmung wurden pro Platte 15 ccm Agar verwendet.

Das antibakterielle Prinzip in Begonia semperflorens

A. Untersuchungen anderer Autoren

Rossberg[21] hatte im Jahre 1958 508 tropisch-subtropische Pflanzenarten auf ihre antibakteriellen Wirkungen geprüft, indem er die Pflanzenteile zerkleinerte und den entstandenen Brei im Lochverfahren gegen acht Keime prüfte. Er stellte dabei fest, dass sich die Begoniazeen durch besondere Aktivität auszeichneten. So hemmten von 94 untersuchten verschiedenen Begonia-Arten 49 mehr oder weniger stark das Bakterienwachstum.

Aufgrund dieser Ergebnisse versuchte Schubnell[22], das in den Begonien enthaltene wirksame Prinzip zu isolieren. Er extrahierte zerkleinerte Blätter von Begonia bunchii 14 Tage mit Methanol, presste den Extrakt ab und trocknete das Filtrat. Den Rückstand löste er in heissem Methanol, filtrierte den unlöslichen Rückstand ab und verdampfte den Methylalkohol. Den Verdampfungsrückstand kochte er eine halbe Stunde mit Azeton am Rückflusskühler, filtrierte und erhielt nach der Kristallisation "lange, nadelförmige Kristalle", die allerdings noch stark verunreinigt waren. Diese Kristalle bewirkten gegen Staphylococcus aureus Hemmhöfe von 30 mm Ø. Sie reagierten stark sauer (pH = 1) und verkohlten bei über 100° C. Die Reindarstellung der Kristalle gelang ihm nicht. Die von Rossberg[21] aufgestellte Liste der antibiotisch wirksamen Begonien erweiterte er um zwei Arten.

Parallel zu den von Rossberg und Schubnell in Berlin durchgeführten Versuchen hatten Toschkov und Scheikova[23] in Sofia ebenfalls das Vorhandensein von bakteriziden Stoffen unter anderem in Begonien festgestellt. Sie begossen die beiden Blattseiten der Pflanzen mit Agarkulturen von Staph. aur., E.coli und S.typhi. Nach unterschiedlichen Einwirkungszeiten wurden die Blatteile auf Normalagar überimpft. Nach 96stündiger Einwirkungszeit waren Staph. aur., nach 72 Stunden S. typhi und E. coli abgetötet.

B. Problemstellung

Da die vorliegenden Ergebnisse eindeutig das Vorhandensein eines antibakteriellen Wirkstoffes in Begoniazeen bewiesen, bestand ein Interesse an der Fortführung der Arbeiten mit dem Ziel, die Identität des wirksamen Pflanzeninhaltsstoffes festzustellen.

C. Eigene Untersuchungen

1. Extraktion

Zu Beginn wurden die von Rossberg[21] und Schubnell[22] durchgeführten Versuche wiederholt: Frisch gepflückte Blätter von Begonia feastii wurden zerkleinert und der Pflanzenbrei in ein mit einem Korkbohrer von 1,4 cm Ø in den Nähragar eingestanztes Loch gepresst. Die Platte wurde anschliessend im Strichverfahren mit Staph. aur. beimpft und 24 Stunden im Brutschrank bei 37° C bebrütet. Danach hatte sich ein bakterienfreier Hof von 2 cm Ø gebildet.

Der gleiche Versuch wurde mit den zerkleinerten Blättern von Begonia bunchii durchgeführt. Das Ergebnis war mit dem des ersten Versuchs identisch: Der Durchmesser des Hofs betrug ebenfalls 2 cm.

Da Rossberg und Schubnell nur die Blätter der Begonien auf ihre antibakterielle Wirkung hin untersucht hatten, wurden zusätzlich Stengel von Begonia bunchii und feastii zerkleinert und ebenfalls im Lochverfahren getestet. Nach der Bebrütung hatten sich Höfe von 2,2 bzw. 2,4 cm Ø gebildet. Diese Ergebnisse gestatteten bei den folgenden Versuchen die Verwendung sowohl der Blätter als auch der Stengel.

Da die Versorgung mit Pflanzenmaterial aus dem Botanischen Garten in Berlin mitunter gering war und es bei diesen Untersuchungen nicht auf die Verwendung von tropisch-subtropischen Begonien ankam, wurden in reichlichem Maße vorhandene einheimische Begonia semperflorens-Pflanzen auf ihre Wachstumshemmung gegenüber Bakterien geprüft. Nach der Beimpfung und Bebrütung hatte sich um das mit zerkleinerten Blättern und Stengeln gefüllte Loch in der Agarplatte ebenfalls ein Hof von 2,8 cm Ø gebildet. Da dieses Ergebnis denen von Begonia bunchii und feastii entsprach und die von Rossberg und Schubnell durchgeführten

Versuche es als wahrscheinlich erscheinen liessen, dass es sich bei der in vitro antibakteriell wirkenden Substanz um einen in der Familie der Begoniazeen weit verbreiteten Pflanzeninhaltsstoff handeln müsse, wurden in der Folgezeit nur noch die Pflanzenteile von Begonia semperflorens verwendet.

In Abänderung des Extraktionsverfahrens von Schubnell, der den Pflanzenbrei kalt mit Methanol extrahiert hatte, wurden die zerkleinerten Pflanzenteile im Soxhlet mit Methanol ausgezogen. Dieses Verfahren garantierte eine wesentlich intensivere Ausbeute, zumal Schubnell festgestellt hatte, dass sich der Wirkstoff unter 100° C nicht zersetzte. Nach dem 5. und 10. Überlauf des Extraktes wurde jeweils etwas Pflanzenbrei entnommen, das Methanol im Trockenschrank verdampft, der Rückstand mit wenig Wasser angefeuchtet und im Lochtest geprüft. Nach dem 10. Überlauf war praktisch keine Hemmung des Bakterienwachstums durch die Blätter mehr zu erkennen. Es wurde deshalb auch bei den folgenden Extraktionen jeweils ein zehnmaliger Auszug durchgeführt.

Der noch heisse Extrakt wurde filtriert, ein kleiner Teil des Filtrats getrocknet, der Rückstand mit etwas Wasser befeuchtet, auf Filterpapier gewischt und durch Auflegen auf eine beimpfte Agarschale gegen Staph. aur. getestet. Da nach dem Bebrüten um das Filter ein Hemmhof entstanden war, erschien es sicher, dass sich der gesuchte Stoff im Filtrat befand.

Bei dem anschliessenden Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum schlug die Farbe von gelbbraun nach karminrot um. Der Rückstand wurde mit Azeton aufgenommen und eine halbe Stunde am Rückflusskühler gekocht. Nach der Aufnahme mit Azeton war ein Farbumschlag nach dunkelgrün sichtbar.

Nach dem halbstündigen Kochen wurde heiss filtriert. Auf dem Filter hinterblieb ein gelbbrauner Rückstand, der

getrocknet, mit Wasser angefeuchtet, auf ein Filterblättchen gewischt und gegen Staph. aur. geprüft wurde. Da nach der Bebrütung nur ein minimaler Hemmhof sichtbar war, der darauf zurückzuführen war, dass der Rückstand nicht ausgewaschen worden war, musste sich das aktive Prinzip noch in der Azetonlösung befinden. Das Azeton wurde nun im Vakuum abdestilliert und der Rückstand im Blättchentest auf seine Wirksamkeit geprüft. Höfe von 3 cm Ø bewiesen, dass sich der Wirkstoff quantitativ im Azeton gelöst hatte. Die Messung des pH des Rückstandes mit Merckschem pH-Papier ergab einen Wert von eins.

Nach einer erneuten Extraktion von Blättern und Stengeln von Begonia semperflorens-Arten wurde zum Schluss das Azeton nicht mehr abdestilliert, sondern an der Luft verdampfen gelassen, um eine eventuelle Kristallisation beobachten zu können. Tatsächlich waren nach dem Verdunsten lange farblose, zum grössten Teil jedoch durch einen Farbstoff verunreinigte Kristalle zu erkennen.

Bevor versucht wurde, den Rückstand säulenchromatographisch aufzutrennen, wurden einige farblose Kristalle in Wasser gelöst und die Lösung mit einem Körnchen Kaliumpermanganat versetzt. Es bildeten sich Bläschen, die in der Flüssigkeit hochstiegen, während die violette Färbung des Kaliumpermanganats verschwand und eine Braunfärbung der Lösung eintrat. Diese Tatsache bewies die reduzierende Eigenschaft der gelösten Kristalle.

2. Identifizierung

Es fiel nach dem letzten Versuch auf, dass als bekannter Reduktionsstoff in den Begoniazeen die Oxalsäure genannt wird[24]; es trat daher die Vermutung auf, dass es sich bei den von Schubnell isolierten Kristallen um die Oxalsäure handeln könnte, zumal er keine vergleichenden Identitätsproben durchgeführt hatte. Diese Möglichkeit

wurde durch den stark sauren pH der Kristalle unterstützt.

Als Blindversuch wurde ein Tropfen einer 3 %igen wässrigen Oxalsäurelösung gegen Staph. aur. getestet. Nach 24stündiger Bebrütung der Agarplatte hatte sich ein Hof von 3 cm Ø gebildet. Die Grösse dieses Hofes entsprach also denen des Begonienextraktes.

Es musste nun versucht werden, die Identität der aufgefundenen Kristalle mit Oxalsäure zu beweisen. Als Methoden wurden die chemische und papierchromatographische verwendet.

a) Chemische Methode

Die langen nadelförmigen Kristalle wurden in Wasser gelöst und mit einer Kalziumchloridlösung versetzt. Es entstand ein Niederschlag, der auf Filterpapier gewischt, auf eine beimpfte Agarplatte gelegt und bebrütet wurde.

Parallel zu diesem Versuch wurde eine 3 %ige wässrige Oxalsäurelösung mit 10 %iger Kalziumchloridlösung versetzt, das entstandene Kalziumoxalat

Formel 1

abfiltriert und unter den gleichen Voraussetzungen wie beim Parallelversuch behandelt. Nach der Bebrütung hatte sich auf beiden Platten kein Hof gebildet; bei beiden Versuchen hatte sich unwirksames Kalziumoxalat gebildet.

Einige der zahlreich übereinanderliegenden weissen Nadeln wurden mit konzentrierter Schwefelsäure übergossen. Auch hierbei reagierten die Kristalle typisch auf Oxalsäure: Sie lösten sich unter Bläschenbildung ohne Schwarzfärbung.

b) Papierchromatographische Methode

Die papierchromatographische Bestimmung der Oxalsäure bereitet infolge eines unspezifischen R_F-Wertes erhebliche Schwierigkeiten. Das Resultat ist nicht eindeutig und nur mit Hilfe chemischer Reaktionen zu erhärten. Nach Hais und Macek [25] wurde nach Auftragung des Azetonextrakts ein Papierchromatogramm in n-Butanol-Ameisensäure-Wasser (10:7:10) mit reiner Oxalsäure als Vergleichssubstanz entwickelt. Nach Besprühen mit Bromkresolgrün waren in beiden Fällen langgezogene Flecken mit R_F-Werten zwischen 0,1 und 0,16 erkennbar.

Dieser Versuch unterstützte den chemischen Identitätsnachweis, so dass als das antibakterielle Prinzip von Begonia semperflorens die Oxalsäure anzusehen ist.

Das antibakterielle Prinzip in den Folia Uvae ursi

Vva Vrſi.

lia illi frequentia,
rentia, Arbuti folijs
leæ Italicæ foliorum
men hirſuta, cum a
tremis ramulis flor
puraſcentes, ſive ca
puraſcés color ad m
ribus ſimiles, & uv
fructum (quem no
rotundum, exigui c
bant: radix parva ſ
de viret.

Vnico loco naſc
& aprico, via regia,
viculo *Venta el baba*
Baça, regno Granat
tio anni M. D. LX
florere, fructum a
planta ad hiemem
læ affirmabant.

PERITIORES qu
oſtendebam, Cha
bant, craſſitudine
cepti. Mihi verò a
tur ἀρκτοσταφύλῳ qu
IIII. De Compoſi
verbis deſcribit.

Vva Vrſi in Pont
& fruticoſa, folio M
rubrum, rotundum

Nam quod non
Theophraſti Vite i
luntur illi meo judi
idæa nihil aliud eſſ
cujus ſuperiore cap
pſi. Et hæc à Vi
quod buxeis folijs ſ
cis prędituꝫ eſt, mu

Abbildung 1

Älteste Abbildung der Bärentraube
(aus "Rariorum plantarum historia" von Carolus Clusius,
Antwerpen, 1601)

A. Allgemeines

In den Pharmakopoeen Deutschlands, Frankreichs, der Schweiz und der UdSSR werden als offizinelle Droge u.a. die getrockneten Blätter von Arctostaphylos uva ursi Sprengel, einer Erikazee, aufgeführt[26]. Diesen Blättern, auch Folia Uvae ursi, Bärentraubenblätter, Folia Garjubae, Achelblätter, Achelkraut, Bärenkraut, Steinbeerblätter und Wolfsbeerenblätter[27], aber auch wilder Buchs, Rausch- oder Mehlgranaten bzw. Totenmyrte genannt, sollen in früherer Zeit Kräfte zur Geister- und Hexenabwehr nachgesagt worden sein[28]. In Deutschland wurden sie seit der Mitte des 18. Jahrhunderts[29] von den Ärzten als Therapeuticum gegen verschiedenartige Erkrankungen verwendet, während ihre heilende Wirkung in Nordeuropa schon wesentlich eher, nämlich im 13. Jahrhundert dem englischen Arzneibuch Meddigon Myddvai aus Wales zufolge[30], bekannt war. In der Allopathie werden die seit Anfang des 19. Jahrhunderts in Deutschland offizinellen[31] Blätter der Bärentraube in getrocknetem Zustand verwendet; die Homöopathie benutzt die frischen Blätter von Arctostaphylos uva ursi.

Die Verordnung der Droge wird von verschiedenen Autoren vorgeschlagen bei Wassersucht, Steinleiden[32], bei chronischem Harnröhren- und Blasenkatarrh, gegen Rheuma und Gicht[26], gegen Entzündungen des Nierenbeckens und der Harnblase[27] sowie als wehenförderndes Mittel[29]. In früheren Zeiten wurden die Bärentraubenblätter ausserdem zur Behandlung der Zuckerkrankheit[33] sowie der Gonorrhoe[34] verwendet. Auch ihre Benutzung als Färbemittel ist heute überholt[35].

Da nach Infektionen der Blase und Niere nach Eingabe von Bärentraubenblättertee eine Besserung der Krankheit - Nachlassen der Schmerzen - in vielen Fällen eintritt, werden die Folia Uvae ursi ausser in der Volksmedizin auch heute noch von verschiedenen pharmazeutischen Fir-

men in Form des Tees oder eines Extraktes der Blätter ihren Präparaten zugefügt. So enthalten von 89 in Rothgangs Spezialitäten-Praktikum[36] aufgeführten Urologica 30 Präparate den Tee oder Extrakt und eines (Vesicaesan Pillen der Firma Chemische Fabrik Reisholz GmbH) den hypothetischen Wirkstoff der Bärentraubenblätter, das Arbutin.

B. Botanik

Berger[27] beschreibt Arctostaphylos uva ursi als "niedrigen, dem Erdboden anliegenden teppichbildenden Spalierstrauch", der hauptsächlich im Alpengebiet Europas, im Süden in Spanien und Portugal, im Norden in Norwegen und Dänemark sowie nach Jaretzky[37] im Himalayagebiet, im Kaukasus und in Nordamerika vorkommt. Als höchsten Standort der Bärentraube gibt Berger[27] 2780 m am Monte Vagoin an. Als bevorzugte Standorte werden "lichte, trockene Wälder, sonnige, magere Weiden, Schwemmböden und Schutthalden, geschützte Felsnischen" und "basisch bis mässig saurer Boden" angegeben[38]. Die Blütezeit ist im April und Mai[28]; die Frucht ist eine Steinfrucht[38].

Über die therapeutisch interessanten Blätter der Erikazee berichtet Berger[27], dass sie "kurz gestielt, 1,2 bis 2,5 cm lang sind und eine durchschnittliche Breite von 0,8 bis 1,2 cm haben". Die ganzrandigen Blätter haben meist eine spatelige Form und sind von "steifer, brüchiger Konsistenz. Die Blattoberseite ist glänzend, dunkelgrün und zeigt ein vertieftes Nervennetz, während die Blattunterseite blassgrün ist und die dunkleren schwach hervortretenden Nerven gut erkennen lässt". Die Blätter aus Spanien sind seinem Bericht zufolge fast doppelt so gross und wesentlich dicker als die aus Tirol.

Die übliche Einteilung der Bärentraubenblätter geschah früher nach ihren Inhaltsstoffen, und zwar in die angeblich nur Arbutin enthaltende Droge aus Finnland, Dänemark, Norwegen, Polen und Spanien und in die sowohl Arbutin als auch Methylarbutin enthaltende aus Tirol und der Schweiz[39]. Diese Einteilung wurde durch Beobachtungen von Kuhn und Schäfer[40] umgestossen, da sie auch in polnischen und spanischen Blättern Methylarbutin nachweisen konnten.

Der Geschmack der Bärentraubenblätter ist anfangs etwas bitter, später süsslich und adstringierend. Der Geruch ist aromatisch teeähnlich[41].

Die Ernte der Blätter soll gegen Ende des Sommers erfolgen, da die im April bis Juni gesammelten quantitativ weniger Inhaltsstoffe, insbesondere Arbutin, als die im August und September geernteten aufweisen[37].

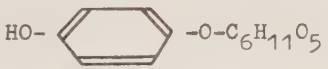
Über das Sammeln der Blätter berichtet der Kommentar zur Pharmacopoea Helvetica[39], dass das Ablesen der einzelnen Blätter zu zeitraubend sei und deswegen die ganzen Äste abgebrochen, im Schatten oder an der Sonne getrocknet und danach die Blätter einfach abgeklopft würden.

C. Inhaltsstoffe

Als Inhaltsstoffe der Folia Uvae ursi werden von Hoppe[26] Arbutin und Methylarbutin, 0,3 bis 0,5 % freies Hydrochinon, Gerbstoffe, Gallussäure, Ellag-, China- und Urolsäure, die Flavonglykoside Quercitrin und Myricitrin sowie 0,01 % ätherisches Öl angegeben. Weiter enthalten die Blätter Enzyme, z.B. das Emulsin, Ameisen-, Zitronen-, Apfelsäure, Harz[27], Fett und Wachs[42] sowie Vitamin C[32].

In der Aussage über die Quantität der Inhaltsstoffe weichen die Angaben voneinander ab. Während Hoppe[26] 12 % Arbutin und Methylarbutin sowie 15 bis 20 % Gerbstoffe angibt, spricht Winkelmann[43] von 2 % Glykosiden und bis zu 34 % Gerb- und Gallussäure. Während Klosa[44], Munk[45] und Enge[46] - dieser jedoch im allgemeinen und nicht im Hinblick auf die Bärentraubenblätter - dem Gerbstoff ausser dem Arbutin eine therapeutische Wirkung zuschreiben, verneint Eichholtz[47] dessen Wirkung. Sämtliche Autoren vertreten dagegen den Standpunkt, dass die Hauptwirkstoffe des Bärentraubenblättertees die Glykoside Arbutin bzw. Methylarbutin sind.

Das Arbutin (Methylarbutin) ist das ß-Glykosid des Hydrochinons (Monomethylhydrochinons):



Arbutin

Methylarbutin

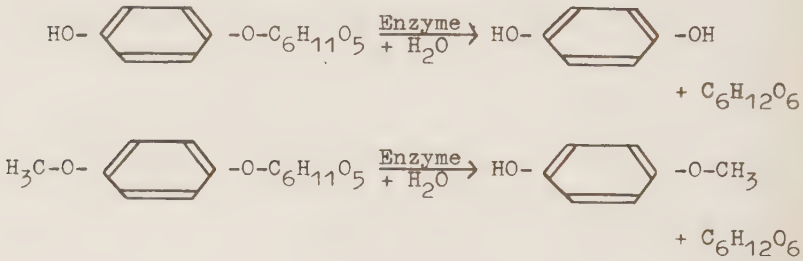
Formel 2 + 3

Die Glykoside können nun durch die in den Bärentraubenblättern im Emulsin enthaltene ß-Glykosidase und durch das Ferment Arbutase in Hydrochinon bzw. Methylhydrochinon und Glukose zerlegt werden.

D. Theorie der Wirkungsweise des Bärentraubenblättertees

Bei Infektionen der Niere und der Blase kann alkalischer Harn ausgeschieden werden, dessen alkalischer pH auf einer Zersetzung des Harnstoffs in Ammoniak und Kohlendioxyd beruht.

In der Praxis wird in solchen Fällen häufig Bärentraubenblättertee verordnet. Seine desinfizierende Wirkung soll auf der Spaltung des (Methyl-) Arbutins in Glukose und das gegen Bakterien stark wirksame (Methyl-) Hydrochinon (Formel 4 + 5) beruhen.



Formel 4 + 5

Als Ort, an dem sich die Spaltung im menschlichen Organismus vollziehen soll, wird die Niere angegeben[48].

E. Problemstellung

Sämtliche Autoren, die sich mit den Bärentraubenblättern und ihrer Wirkung bei Blasen- und Nierenerkrankungen beschäftigen, erklären eindeutig, dass eine Behandlung mit der Droge nur zweckmässig sei, wenn alkalischer Harn vorliege, da anderenfalls die Spaltung des Glykosids nicht erfolgen könne und damit praktisch auch keine Erfolge zu verzeichnen seien.

Hieraus ergibt sich die Problemstellung der folgenden Arbeit:

1) Die Folia Uvae ursi wirken nur bei Infektionen mit alkalischem Harn. Da Glykoside prinzipiell nur im sauren Milieu gespalten werden können, befriedigt die Erklärung der Spaltung durch einen alkalischen pH des Urins nicht. Auch die im menschlichen Verdauungstrakt vorkommenden Säuren können das Glykosid nicht spalten, da der pH 4 im Organismus nicht unterschritten wird und diese Wasserstoffionenkonzentration zur Spaltung nicht ausreicht.

2) Es besteht die Möglichkeit, dass das in der Droge vorhandene Arbutin im Magen-Darmkanal durch gleichzeitig applizierte ß-Glykosidase gespalten wird. Zur Resorption käme nach dieser Hypothese das freie Hydrochinon. Nach allen vorliegenden Stoffwechseluntersuchungen über phenolische Substanzen erscheint das sehr unwahrscheinlich, vielmehr müsste man annehmen, dass das Spaltprodukt Hydrochinon infolge Reaktion mit Glucuronsäure als entgiftetes Glucuronid ausgeschieden wird.

3) Denkbar wäre ferner eine Resorption des intakten Glykosids, das erst sekundär im Harn durch glykosidspaltende Fermente der Bakterien abgebaut wird.

In vitro sind Spaltungen durch Bakterienfermente grundsätzlich möglich (Äskulinspaltung von ß-Glykosidasen der Enterokokken[49]). Ob die pathogenen Organismen, die Cystitiden mit alkalischem Harn verursachen, Arbutin zu spalten vermögen (in vitro und/oder in vivo), ist bisher nicht eingehend untersucht worden; doch erscheint es möglich, dass die bakteriostatische Wirksamkeit des Bärentraubenblättertees auf diesen Wirkungsmechanismus zurückgeführt werden kann.

4) Als letzte Möglichkeit, die Wirkung des Tees zu erklären, bleibt folgende Annahme: Arbutin ist gar nicht der spezifische Wirkstoff, d.h. das bakteriostatische Prinzip der Folia Uvae ursi, vielmehr ist die bakteriostatische Aktivität an einen anderen noch unbekannten Inhaltsstoff der Droge geknüpft.

Zu den Fragen 1 - 2 haben Winter und Hornbostel[50] Untersuchungen angestellt, indem sie nach Eingabe von Bärentraubenblättertee das Hydrochinon quantitativ im Harn von Ratten und Menschen nachwiesen und zu dem überraschenden Ergebnis kamen, dass als tägliche Mindestmenge des zu verabreichenden Tees eine Gabe von 3 - 4mal je 100,0 g Kaltextrakt nötig wären (das wäre etwa das Zwanzigfache der in der Praxis üblichen Menge), damit das freiwerdende Hydrochinon eine wirksame therapeutische Wirkung ausüben könne.

Die unter 3 und 4 der Problemstellung aufgezeigten Möglichkeiten liegen als Arbeitshypothese den vorliegenden Untersuchungen zugrunde. In-vivo-Untersuchungen sollen zeigen, ob bestimmte pathogene Mikroorganismen mit ß-Glykosidase ausgestattet sind und ob sie Arbutin in freies Hydrochinon und d-Glukose zu spalten vermögen.

Weiter sollen in-vitro-Versuche zeigen, ob in den Bärentraubenblättern ein bakteriostatischer Stoff enthalten ist, der nicht mit dem Arbutin identisch ist. Nach einer Isolierung dieser Substanz ist ihre Resorption im menschlichen Organismus und damit die antibakterielle Wirksamkeit der Fòlia Uvae ursi in vivo zu prüfen.

F. Eigene Untersuchungen

1. Antibakterielle Wirkung in vitro

Zu Beginn der eigenen Untersuchungen musste festgestellt werden, ob der Bärentraubenblättertee bereits in vitro, also vor der Körperpassage und damit vor der theoretischen Spaltung in das wirksame Prinzip, einen antibakteriellen Effekt hat und inwieweit im positiven Fall das Arbutin an der Wirkung beteiligt ist.

Zu diesem Zweck wurde die grob gepulverte Droge mit wenig Wasser befeuchtet, um den Wirkstoff zu lösen und ihm im folgenden Versuch das Diffundieren in den Agar zu erleichtern. Anschliessend wurde der Brei im Lochtest gegen Staphylococcus aureus geprüft. Nach eintägiger Bebrütung hatte sich um das Loch ein bakterienfreier Hof von 3 - 3,5 cm Ø gebildet.

Im Vergleich mit der getrockneten Droge wurden darauf frische zerkleinerte Blätter der Bärentraube sowie einiger anderer Pflanzen, die sich z.T. ebenfalls durch einen verhältnismässig hohen Arbutingehalt auszeichnen, im gleichen Verfahren getestet. Bei konstantem Lochdurchmesser ergaben sich für die einzelnen Pflanzen folgende Werte:

Pflanze	Hemmhofdurchmesser
Arctostaphylos Uva ursi	2,0 cm
Vaccinium Vitis idaea	1,6 cm
Vaccinium myrtillus	---
Calluna vulgaris	---
Pirus communis	praktisch ---

Tabelle 1

Die Ergebnisse dieser Versuche hinsichtlich der bakteriostatischen Wirkung von Arct. Uv. ur. und Pir. com.

decken sich mit denen Winters[51]. Sie hatten also bewiesen, dass in den Folia Uvae ursi ein in vitro bakteriostatisches Prinzip enthalten ist, das aber vermutlich nicht aus Arbutin besteht, da sonst auch die Birnenblätter infolge ihres hohen Glykosidgehalts bakteriostatische Eigenschaften gezeigt hätten.

2. Darstellung von Arbutin

Um diese Vermutung zu erhärten, wurde Arbutin aus den Folia Uvae ursi hergestellt. Es ergab sich dadurch die Möglichkeit, die einzelnen Phasen auf ihre hemmende Wirkung zu untersuchen und so eventuell sofort festzustellen, ob und wann das wirksame Prinzip in eine Nebenphase ausgeschieden wurde.

Da in der Praxis wässrige Extrakte des Tees durch halbstündige Abkochungen hergestellt werden, war damit zu rechnen, dass der gesuchte Stoff nicht flüchtig ist. Es wurde deshalb eine viermalige Extraktion von ca. 100,0 g der grob gepulverten Droge mit jeweils 500 ccm Wasser durch halbstündiges Kochen hergestellt. Nach jedem Auszug wurde heiss filtriert und ein Tropfen des Filtrats auf eine mit Staph. aur. beimpfte Agarschale gegeben. Nach der Bebrütung hatten sich auf allen Schalen Höfe von ca. 2,5 cm Ø gebildet. Das bakteriostatische Prinzip war demnach in den Extrakten vorhanden. Zur Weiterverarbeitung wurde das Darstellungsverfahren des Arbutins nach Hager[52] benutzt. Die vier wässrigen Extrakte wurden vereinigt und mit 200 ccm Bleiazetatlösung versetzt. Es entstand ein dicker gelber Niederschlag, der nach dem Absetzen abfiltriert wurde. Die quantitative Fällung wurde durch Zugabe von wenig Liquor Plumbi subacetici geprüft. Ein Tropfen des Filtrats wurde auf eine beimpfte Agarschale gegeben und diese bebrütet. Nach 24 Stunden war ein keimfreier Hof von 3 cm Ø entstanden. Damit war bewiesen, dass sich der wirksame Stoff noch in Lösung befand.

Um das Filtrat von dem überschüssigen Blei zu befreien, wurde in die Lösung Schwefelwasserstoff eingeleitet; das gebildete schwarze Bleisulfid wurde abfiltriert und das Filtrat auf kleiner Flamme eingeengt.

Da die Möglichkeit bestand, dass durch die Schwefelwasserstoffeinleitung auch der Wirkstoff gefällt worden war, wurde ein Tropfen des eingeengten Filtrats auf seine Wirksamkeit gegen Bakterienwachstum geprüft. Nach der Bebrütung der Platte war ein keimfreier Hof von 3,5 cm Ø entstanden.

Nach weiterer Einengung auf ein kleines Volumen entstanden nach dem Abkühlen Kristalle, die nach den Angaben der Arbeitsvorschrift das verunreinigte Arbutin darstellten. Der Rückstand wurde mit siedendem Wasser aufgenommen und zur Klärung Tierkohle hinzugefügt. Nach der Filtration wurde die Lösung bis zur sirupösen Konsistenz eingeengt und ein Tropfen davon wiederum gegen Staph. aur. getestet. Nach der Bebrütung der Agarplatte hatte sich ein Bakterienrasen gebildet, der keinen Hof aufwies. Die Vermutung, dass der Wirkstoff an die Kohle adsorbiert worden war, wurde durch einen Blättchentest bewiesen, indem wenig abfiltrierte Kohle auf Filterpapier gewischt und dieses auf eine beimpfte Agarschale gelegt wurde. Nach 24stündiger Bebrütung hatte sich ein bakterienfreier Hof von 3 cm Ø um das Blättchen gebildet.

Um das aus diesem Versuch resultierende Ergebnis zu erhärten, wurde eine andere Methode der Arbutindarstellung nach Winterfeld[53] durchgeführt. Nach der oben beschriebenen wässrigen Extraktion wurde das Filtrat eingeengt und mit Kaliumkarbonat im Überschuss versetzt. Danach wurde das Gemisch viermal mit je 100 ccm 96 %igem Alkohol ausgeschüttelt; die dunkelbraunen Lösungen wurden vereint und filtriert. Nach der Vorschrift wurde wasserfreies Natriumsulfat frisch geglüht, das Salz zu der alkoholischen Ausschüttelung gegeben und ausgeschüt-

telt. Anschliessend wurde filtriert und das Filtrat im Vakuum auf ca. 20 ccm eingeengt. Zu dem Rückstand wurden 150 ccm Äther gegeben; nach längerem Schütteln wurde wiederum filtriert. Das Filtrat hatte eine gelbbraune Farbe und opalisierte stark. Da eine freiwillige Kristallisation nicht erfolgte, wurde die Lösung einige Zeit bis zur beginnenden Kristallbildung in einem offenen Gefäss stehen gelassen. Anschliessend wurden die Kristalle abfiltriert, auf dem Filter getrocknet, mit einem Tropfen Wasser verrieben und mit dem Filterpapier, das jetzt mit der Lösung getränkt war, auf eine beimpfte Agarschale gelegt. Nach eintägiger Bebrütung hatte sich um das Filter, das einen Durchmesser von ca. 1,5 cm hatte, ein minimaler Hemmhof von 1,6 bis 1,7 cm Ø gebildet.

Da nach Winterfeld[53] die abfiltrierten und gegen Staph. aur. getesteten Kristalle aus gering verunreinigtem Arbutin bestehen sollten, ihre bakteriostatische Wirkung im Verhältnis zu dem Ausgangsextrakt des Bärentraubenblättertees jedoch wesentlich geringer war, wurde vermutet, dass der geringe Hemmhof auf die Verunreinigung zurückgeführt werden musste.

In einem letzten Versuch wurde die Annahme der bakteriostatischen Unwirksamkeit des nicht gespaltenen Glykosids mit chemisch reinem Arbutin bewiesen.

3. Prüfung von Arbutin auf bakteriostatische Wirkung

Aus Arbutin der Fa. Merck wurde eine 5 %ige wässrige Lösung hergestellt. Ein Tropfen der Lösung wurde auf eine mit Staph. aur. beimpfte Agarplatte gegeben und diese 24 Stunden bebrütet. Am anderen Tage war keine Beeinträchtigung des Bakterienwachstums festzustellen. Dieser Befund deckte sich also mit dem Ergebnis der Prüfung des Glykosids, das durch Extraktion aus der Droge gewonnen worden war.

Da die Wirkung des Arbutins u.U. vom pH abhängen soll, wurde eine 5 %ige Lösungsreihe mit den pH-Werten von 4 bis 9,5 mit jeweils 0,5 pH-Differenz hergestellt. Eine saurere bzw. alkalischere Lösung brauchte nicht hergestellt zu werden, da diese Werte im menschlichen Organismus weder über- noch unterschritten werden.

Um die Versuche noch weiter den Vorgängen im menschlichen Körper anzugleichen, wurden die Lösungen 24 Stunden im Brutschrank bei 37° C aufbewahrt. Eine anschliessende Probe, bei der wiederum auf die beimpften Platten je ein Tropfen der Lösungen mit verschiedenem pH-Wert gegeben wurde, verlief ebenfalls negativ, d.h. es traten keine Hemmzonen auf.

Als letzter Versuch dieser Reihe wurde je eine 5 %ige Arbutinlösung mit dem pH = 4 und dem pH = 9,5 eine halbe Stunde am Rückflusskühler gekocht. Eine Spaltung in freies wirksames Hydrochinon und Glukose war nicht erfolgt, da die Proben auf Hydrochinon (bakterienfreie Hemmzone) und Glukose (mit Nylander und Fehling) negativ verliefen.

4. Extraktion

Da bei den vorhergehenden Versuchen in dem Bärentraubenblättertee ein in vitro antibakteriell wirkendes Prinzip festgestellt worden war, wurde als nächstes versucht, den unbekannten Stoff zu isolieren.

Zu Beginn wurde die Droge mit Wasser ausgezogen. Im Gegensatz zu den üblicherweise verordneten gestossenen Blättern der Folia Uvae ursi wurde dazu grobes Pulver der Droge verwendet, da Peyer[54] festgestellt hatte, dass"mit fortschreitender Zerkleinerung der Droge ihre Erschöpfbarkeit wächst".

100,0 g gepulverte Blätter wurden mit 500 ccm Wasser übergossen und das Gemisch 3/4 Stunden gekocht.

Nach dem Abkühlen und Absetzen wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen und filtriert. Auf den Teerückstand wurden erneut 500 ccm Wasser gegeben und 3/4 Stunden gekocht.

Da bereits bei der Arbutindarstellung aus der Droge festgestellt worden war, dass eine viermalige Wasserextraktion nicht genügte, um den antibakteriellen Wirkstoff auch nur annähernd auszuziehen, wurden insgesamt zehn Extrakte hergestellt. Ein Tropfen des letzten Auszugs zeigte nach der Bebrütung einer beimpften Agarplatte nur noch einen geringen, schon schwach bewachsenen Hemmhof.

Die wässrigen Extrakte wurden nun vereinigt und auf dem Wasserbad bis zur sirupösen Konsistenz eingedampft. Nach dem Erkalten wurde wenig dunkelbrauner Rückstand auf ein feuchtes Filterpapier gewischt und dieses gegen Staphylokokken geprüft. Es entstanden hierbei Höfe von 3,5 bis 4 cm Ø. Gegenüber den Versuchen mit den nicht-eingedampften wässrigen Extrakten hatten sich die Durchmesser der keimfreien Höfe also vergrössert (von 2,5 auf 3,5 bis 4 cm), was eine stärkere Konzentration des gesuchten Stoffes und ausserdem seine Nichtflüchtigkeit auch bei längerer Erhitzung bewies.

Zur weiteren Abspaltung der unerwünschten Begleitstoffe wurde der Extraktionsrückstand mit der dreifachen Menge Methanol übergossen und 3/4 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Während des Kochens bildete sich ein grober Niederschlag, der nach dem Kaltwerden abfiltriert, bis zum farblosen Durchlauf mehrere Male mit Methanol nachgespült und dann im Trockenschrank getrocknet wurde. Danach hatten sich dunkle, schwer brechbare Brocken gebildet. Sie wurden in wenig heissem Wasser gelöst und einige Tropfen der Lösung auf eine beimpfte Agarplatte gebracht. Nach der Bebrütung hatte sich kein Hof gebildet. Der wirksame Stoff musste sich also noch in der Methanollösung befinden.

Im Methanolauszug, der zwei Tage lang im Kühlschrank aufbewahrt worden war, hatten sich in der Zwischenzeit gelbliche Kristalle gebildet, die abfiltriert, getrocknet und nach der Lösung in Wasser gegen Staph. aur. geprüft wurden. Auch diese Kristalle zeigten keine Hemmwirkung.

Der Methanolextrakt wurde nun im Vakuum bis zur sirupösen Konsistenz eingeengt und danach 24 Stunden im Trockenschrank getrocknet. Eine Probe des Rückstands wurde anschliessend auf seine Hemmwirkung untersucht. Nach 24stündiger Bebrütung war ein Hof von 4,5 cm Ø entstanden, was einen weiteren Konzentrationsanstieg des gesuchten Stoffes bewies.

Der Methanolrückstand wurde nun mit der dreifachen Menge Äther versetzt und 3/4 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Darauf wurde heiss filtriert und der Äther an der Luft verdampft. Während dieses Vorganges bildeten sich lange weisse Nadeln, die nach dem vollständigen Verdunsten eine dunkelgelbe Färbung angenommen hatten. Ein Teil des Rückstands wurde in wenig Wasser gelöst und auf seine antibakterielle Wirksamkeit geprüft. Nach der Bebrütung hatte sich um das Filter, auf das die Lösung getropft worden war, ein bakterienfreier Hof von 4 bis 4,5 cm Ø gebildet.

Nachdem die Löslichkeit des wirksamen Prinzips in Äther festgestellt worden war, wurden der Methanolextraktionsrückstand noch dreimal mit Äther ausgekocht, der Äther abgedampft und die Rückstände, deren Farbe im Laufe der Auszüge immer dunkelgelber wurde, vereinigt. Bei dem letzten Ätherauszug hinterblieb nach dem Verdunsten einer Probe nur noch ein minimaler Rückstand.

Der extrahierte Methanolauszug wurde nochmals auf seine Wirksamkeit geprüft, um festzustellen, ob die Ätherextraktion erschöpfend gewesen war. Dabei stellte es sich nach der Bebrütung heraus, dass der übrig ge-

bliebene Wirkstoff ausreichte, um immer noch einen bakterienfreien Hof von 4 cm Ø hervorzurufen. Es musste also versucht werden, mit einem anderen Lösungsmittel einen quantitativeren Auszug durchzuführen.

Zu diesem Zweck wurde der bereits mit Äther extrahierte Methanolrückstand mit der dreifachen Menge Azeton übergossen und viermal 3/4 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Nach dem Verdunsten einer Probe des vierten Auszugs hinterblieb nur noch ein geringer Rückstand. Die Filtrate, die eine gelbe Färbung hatten, wurden vereinigt und das Azeton im Vakuum abdestilliert. Es entstand eine sirupöse dunkelgelbe Masse, in der Kristalle nicht erkennbar waren.

Ein Teil des Rückstands wurde nach dem völligen Verdunsten des Azetons auf ein feuchtes Filterpapier gewischt und auf seine Wirksamkeit gegenüber Staph. aur. geprüft. Nach der Bebrütung der Agarplatte war ein Hof von 4,3 cm Ø sichtbar.

Parallel wurde der mit Azeton extrahierte Methanolrückstand auf seine antibakterielle Wirksamkeit geprüft, um festzustellen, ob die Azetonextraktion erschöpfender war als der Ätherauszug. Da jedoch immer noch ein grosser Hof (4,2 cm Ø) entstand, konnte auch nach einer viermaligen Azetonextraktion von einem quantitativen Auszug nicht die Rede sein. Der Methanolrückstand wurde deshalb 3/4 Stunden mit Chloroform am Rückflusskühler gekocht. Dabei wurde das Chloroform schwach gelb gefärbt. Nach der heissen Filtration wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Es hinterblieb ein minimaler gelber Rückstand, der nach einer Prüfung auf seine Wirksamkeit gegen Staph. aur. einen Hof von 2 cm Ø bildete. Nach diesem Ergebnis kam Chloroform als Lösungsmittel nicht in Betracht.

Bevor weitere Versuche zur völligen Extraktion des wirksamen Prinzips aus dem Methanolrückstand unternommen wurden, wurde der Azetonextrakt, der im Gegensatz zum

Ätherauszug wesentlich verunreinigter war, was schon an der dunkleren Färbung der Lösung zu erkennen war, weiter aufgearbeitet. Er wurde in einen Scheidetrichter gegeben und mit Äther ausgeschüttelt. Es bildete sich eine hellgelbe Lösung, die von dem dunkelbraunen sirupösen Azetonextrakt abgetrennt wurde. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels bildete sich eine grosse Menge gelber Kristalle, die z.T. wieder eine lange Nadelform aufwiesen. Eine Probe zeigte keimfreie Hemmhöfe von 4,5 bis 4,7 cm Ø.

Ein Teil des wirksamen Rückstands wurde mit heissem Wasser aufgenommen und mit Bleiazetatlösung versetzt. Der entstandene dicke gelbe Niederschlag wurde abfiltriert und ausgewaschen. In das Filtrat, das schwach gelb gefärbt war, wurde H_2S eingeleitet. Der Sulfidniederschlag wurde ebenfalls abfiltriert und ausgewaschen, das Wasser der Lösung durch schwaches Erhitzen verdampft und der Rückstand auf seine hemmende Wirkung geprüft; die Höfe von 2,5 bis 2,8 cm Ø zeigten, dass diese Methode zur Reinigung der Kristalle nicht zu verwerten war.

Die gelben Kristalle der verschiedenen Ätherrückstände wurden auf ihren pH geprüft. Sie ergaben Werte zwischen 3,5 bis 4,5, gemessen mit Merckschem Indikatorpapier.

Da durch die oben beschriebene Ätherausschüttelung ein gewisser Fortschritt in der Isolierung des bakteriostatisch wirksamen Stoffes erzielt worden war, wurde auch bei den folgenden Extraktionen der Bärentraubenblätter diese Methode beibehalten: Der dunkelbraune Methanolrückstand wurde in Wasser gelöst und die Lösung mit der doppelten Menge Äther im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Nach fünfminütigem Schütteln wurde die wässrige Schicht abgelassen, die ätherische Schicht mit getrocknetem Natriumsulfat vom Wasser befreit und filtriert. Das Filtrat hatte eine hellgelbe Farbe.

Da nach fünfzehnmaligem Ausschütteln eine Probe der wässrigen Lösung gegen Staph. aur. keine nennenswerte

Wachstumshemmung mehr zeigte, erwies sich diese Extraktionsart als nahezu quantitativ.

Aus den vereinigten Auszügen wurde der Äther im Vakuum abdestilliert. Die Lösung wurde darauf mit Aktivkohle ausgeschüttelt und filtriert. Die vorher gelbe Lösung war nach der Filtration nahezu farblos. Der Rest des Äthers wurde an der Luft verdunstet und der Rückstand unter dem Mikroskop betrachtet. Es waren u.a. lange schmale Nadeln sichtbar, die z.T. verzweigt waren, sowie kleine dicke Bruchstücke von Kristallen.

Der Rückstand wurde wiederum gegen Staph. aur. getestet und ergab Höfe von 4 cm Ø.

Um festzustellen, ob ein Teil des Wirkstoffes von der Aktivkohle adsorbiert worden war, wurde der Filterrückstand angefeuchtet, auf eine beimpfte Platte gelegt und bebrütet. Nach 24 Stunden hatte sich ein Hof von 3 bis 3,5 cm Ø um das Filter gebildet. Da damit eine ziemlich grosse Adsorption des gesuchten Stoffes an die Kohle bewiesen war, konnte dieses Verfahren nicht weiter verwendet werden.

5. Papierchromatographische Untersuchungen

Um die Reinheit des Ätherrückstands zu prüfen, wurden Papierchromatogramme angefertigt. Dabei wurde nach der aufsteigenden Methode gearbeitet: Einige Tropfen der stark verdünnten Lösung wurden auf einen bezeichneten Punkt der Startlinie gebracht und getrocknet. Danach wurde das Chromatogramm in ein Entwicklungsgefäss gestellt, auf dessen Boden sich das Fliessmittel befand. Als Papier wurden Filtrierpapierbogen Nr. 2043 b der Firma Schleicher & Schüll, als Fliessmittel 15 %ige Essigsäure und später Partridgegemisch (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5) verwendet.

Das Essigsäurechromatogramm wurde getrocknet und un-

ter kurzwelligem ultraviolettem Licht betrachtet. Dabei waren folgende vier Flecken zu erkennen: Bei einem R_F-Wert von 0,08 ein hellblauer, bei 0,3 ein dunkler, bei 0,5 ein violett gefärbter und bei 0,95 ein hellblauer (s. Abb. 2a S. 39).

Das Chromatogramm wurde ohne Rücksicht auf die Lage der Flecken in Stücke von 1,5 cm Länge geschnitten und diese nach dem Befeuchten mit Wasser auf beimpfte Agarplatten gelegt. Nach eintägiger Bebrütung hatte sich auf keiner Schale ein nennenswerter Hof gebildet. Da dieses negative Ergebnis auf eine zu geringe Konzentration der aufgetropften Lösung zurückgeführt werden musste, wurde ein neues Chromatogramm angefertigt, wobei eine stärker konzentrierte Lösung auf die Startlinie getropft wurde. Nach dem Zerschneiden und Bebrüten hatte sich ein Hof um das Papierstück gebildet, auf dem der unter UV-Licht violett erscheinende Fleck (R_F = 0,5) gelagert war.

Als Vergleich wurde ein Butanol-Eisessig-Wasser-Chromatogramm angefertigt und nach dem Trocknen ebenfalls unter kurzwelligem UV-Licht betrachtet. Dieses Chromatogramm hatte fünf Flecken, und zwar bei einem R_F-Wert von 0,33 einen hellblauen, direkt anschliessend bei 0,42 einen violetten, bei 0,6 einen dunkellila und direkt anschliessend bei 0,66 einen hellblauen und schliesslich bei 0,74 einen dunkelbräunlichen (s. Abb. 2b S. 39).

Dieses Chromatogramm wurde ebenfalls in 1,5 cm lange Streifen geschnitten, mit wenig Wasser befeuchtet, auf beimpfte Platten gelegt und bebrütet. Nach 24 Stunden hatten sich um den zweiten und dritten Fleck Höfe von 4 und 2 cm Ø gebildet. Da bei der verwendeten Länge des Chromatogramms (20 cm) der 2. und 3. Fleck direkt nebeneinander lagen bzw. ineinander übergingen, wurde ein längeres Chromatogramm (35 cm) angefertigt, um diese beiden Flecken nach Möglichkeit exakt zu trennen. Dieser Versuch gelang nicht, die beiden Flecke lagen auch nach der

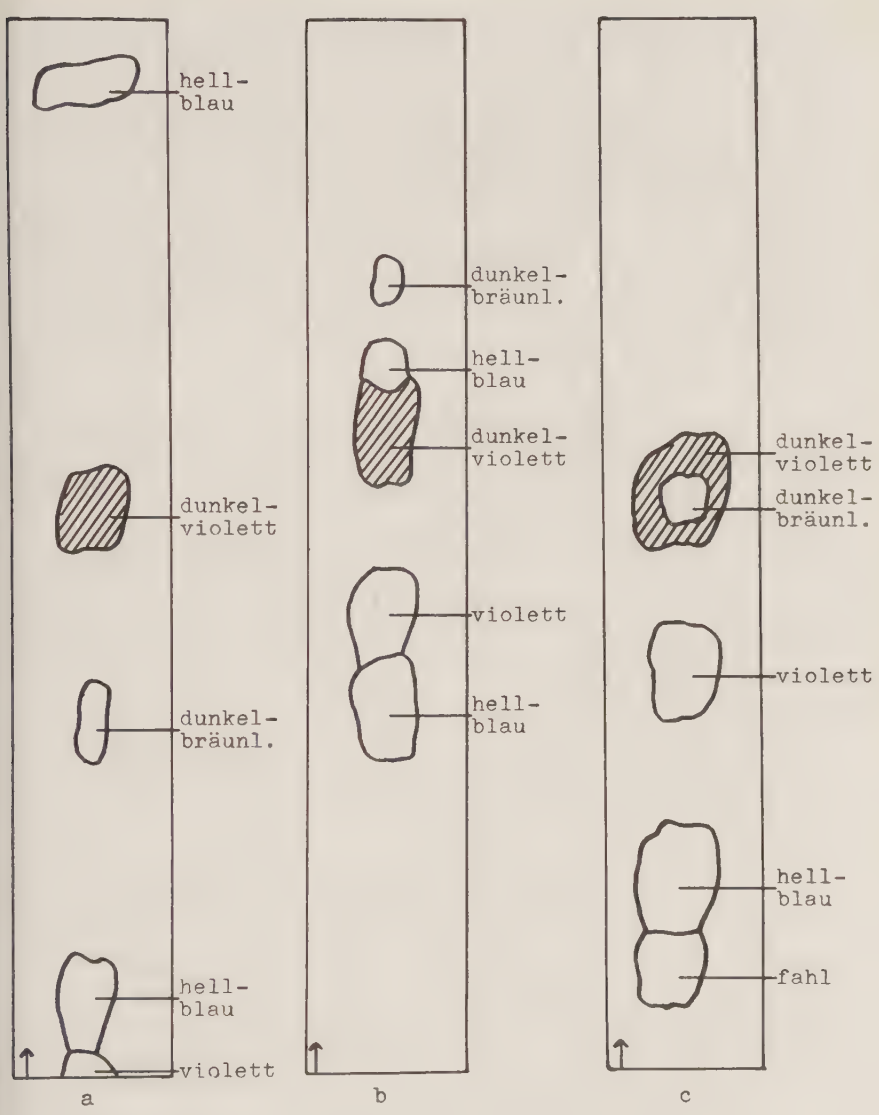


Abbildung 2

Papierchromatogramme des Ätherextrakts

Die schraffierten Flecke zeigten gegen Staph. aur. eine hemmende Wirkung.

längeren Wegstrecke direkt nebeneinander bzw. gingen ineinander über.

Ein neues Chromatogramm wurde mit dem Fliessmittel Phenolum liquefactum und Aqua destillata 1:1 angesetzt. Dieses Chromatogramm hatte unter kurzwelligem UV-Licht ebenfalls fünf Flecke, und zwar bei einem R_F-Wert von 0,09 einen fahlen, bei 0,18 einen hellblauen, bei 0,38 einen violetten und bei 0,54 einen ebenfalls violetten Fleck. In der Mitte des verhältnismässig grossen obersten Flecks befand sich ein kleinerer dunkel gefärbter (s. Abb. 2c S. 39).

Auch dieses Chromatogramm wurde in 1,5 cm lange Streifen zerschnitten und nach dem Befeuchten auf beimpfte Platten gelegt und bebrütet. Um den Streifen, auf dem sich der violette mit dem darauf liegenden dunklen Fleck befand, hatte sich wiederum ein Hof von 3,5 bis 4 cm Ø gebildet.

Um eine ungefähre chemische Bestimmung des wirksamen Stoffes durchzuführen, wurden zwei weitere Chromatogramme mit Partridgegemisch als Fliessmittel angefertigt und eins nach dem Trocknen mit zweiprozentiger Eisenchloridlösung besprüht. Dabei färbte sich die unter UV-Licht violett gefärbte Zone sofort blauschwarz. Die Färbung hielt auch nach dem Trocknen an.

Da die blauschwarze Farbe auf Anwesenheit von phenolischen OH-Gruppen schliessen liess, wurde eine weitere Methode zu ihrem Nachweis durchgeführt: Es wurde eine 0,5 %ige Echtblau-B-Lösung Merck hergestellt und das Chromatogramm damit besprüht[55]. Die Flecken, die sich als bakteriostatisch wirksam erwiesen hatten, wurden rötlich gefärbt. Damit war auch diese Reaktion auf phenolische Gruppen positiv verlaufen.

Da nun der ungefähre R_F-Wert der in vitro wirksamen Substanz feststand, wurde ein Vergleichschromatogramm hergestellt, auf dem nebeneinander die isolierte Substanz,

Arbutin und Hydrochinon liefen. Als Fliessmittel wurde das Partridgegemisch verwendet. Nach dem Trocknen des Chromatogramms war unter UV-Licht sofort zu erkennen, dass die gesuchte Substanz weder mit dem Arbutin noch dem üblicherweise für die Wirkung des Bärentraubenblättertees verantwortlich gemachten Hydrochinon identisch war (Abb. 3).

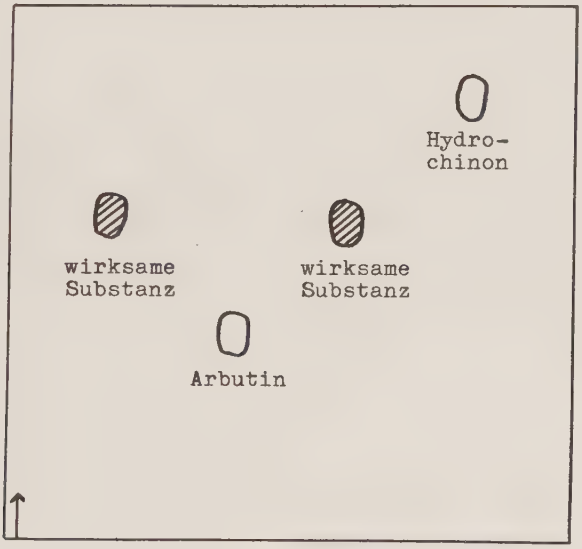


Abbildung 3

Da durch die Papierchromatogramme (s. Abb. 2 S. 39) bewiesen werden konnte, dass die wirksame Substanz nach der Ätherextraktion nicht rein vorlag, musste nun versucht werden, das Gemisch durch die Säulenchromatographie aufzutrennen.

6. Säulenchromatographische Untersuchungen

Da der Ätherrückstand sauer reagierte, wurde versucht, ihn mittels der Säulenchromatographie mit saurem Aluminiumoxyd Merck zu trennen. Zu diesem Zweck wurde der Rückstand in heissem Äther gelöst und die Lösung durch eine Säule, die mit saurem Aluminiumoxyd beschickt worden war, gegeben. Da es sich hierbei erst um einen orientierenden Vorversuch handelte, wurde nur eine kurze Säule von ca. 20 cm Länge und 1,5 cm Ø verwendet.

Nach kurzer Zeit bildeten sich zwei Phasen, wovon die oberste gelb, die direkt darunterliegende orange gefärbt war. Das durchlaufende Filtrat war schwach gelb gefärbt. Eine Probe des Eluatrückstands nach dem Verdunsten des Äthers ergab gegen Staph. aur. keine Hemmhöfe. Während der weiteren Eluierung mit Äther wurden folgende Farbphasen von oben nach unten sichtbar: Bräunlich, gelb, orange, weiss, grün, weiss. Nach längerer Eluierung wurden die Säule vorsichtig ausgestossen und die Proben der einzelnen Phasen auf beimpfte Agarschalen gesetzt. Da vorher in einem Blindversuch festgestellt worden war, dass das saure Aluminiumoxyd nicht antibakteriell wirksam war, brauchte im Rahmen dieses Vorversuchs keine Eluation der einzelnen Zonen zu erfolgen.

Nach der Bebrütung der Schalen waren deutlich Höfe um die Proben der gelben, orangen, weissen und grünen Phase zu erkennen. Ein exakter Durchmesser war nicht zu ermitteln, da das Aluminiumoxyd während der Bebrütung eingetrocknet und zusammengefallen war. Aus dem Ergebnis dieses Versuchs war ersichtlich, dass eine exakte Trennung des gesuchten Stoffes von den Begleitsubstanzen mit saurem Aluminiumoxyd nicht zu erreichen war.

Da mittels der Papierchromatographie festgestellt worden war, dass es sich bei dem gesuchten Stoff um eine phenolische Substanz handeln müsse, wurde anstatt des

sauren Aluminiumoxyds das Versuchsprodukt PP 15 Sp der Badischen Anilin- und Sodafabrik verwendet, das sich bei der Auftrennung von Phenolen in dem Pharmazeutischen sowie in dem Pharmakognostischen Institut der Freien Universität Berlin gut bewährt hatte. Eine ca. 20 cm lange Glassäule wurde mit einer Aufschlämmung des Versuchsproduktes gefüllt. Nach dem Absetzen und mehrmaligen Nachspülen mit Wasser und 30 %igem Methanol wurde eine wässrige Lösung des Ätherrückstands durch kurzes Aufkochen hergestellt und nach dem Abkühlen in die Glasröhre gegeben. Nach längerem Nachspülen mit Wasser bildete sich eine schmale gelbbraun gefärbte Schicht. Da es sich bei diesem Versuch nur um eine Vorprobe handelte, wurde bald mit 15 und darauf mit 30 %igem Methanol eluiert. Es ergaben sich folgende Schichten von oben: Direkt unter der Oberfläche eine bräunlich-fleischfarbene, dann eine gelbe, unmittelbar anschliessend eine fleischfarbene, darunter wieder eine gelbe. Es folgte eine schmale weisse und darunter eine hellgrau gefärbte Schicht. Diese Färbungen wurden bei Tageslicht beobachtet.

Nach weiterer Eluation und damit weiterem Auseinanderziehen der gefärbten Schichten wurde der Durchlauf gelb gefärbt. Nachdem er wieder eine weisse Färbung angenommen hatte, wurde das Eluat auf dem Wasserbad vorsichtig eingeengt. Es hinterblieb ein bräunlicher Rückstand. Ein Teil wurde auf etwas feuchtes Filterpapier gewischt, auf eine mit Staph. aur. beimpfte Agarschale gelegt und diese bebrütet. Nach einem Tag hatte sich ein Hof von ca. 4,5 cm Ø gebildet.

Es bestand die Möglichkeit, dass minimale Mengen des BASF-Produkts bei dem Durchlauf in das Eluat gelangt waren und selbst eine gewisse antibiotische Wirkung entfaltet hatten. Deswegen wurde eine Blindprobe des reinen Versuchsprodukts unter den gleichen Bedingungen angesetzt. Da nach der Bebrütung kein bakterienfreier Hof entstanden war,

konnte es für die aktive Wirkung des Eluatrückstands also nicht verantwortlich gemacht werden.

Um zu untersuchen, ob die gelbliche Substanz der eigentliche Wirkstoff war, wurde die Säule so lange weiter eluiert, bis nach dem Verdunsten des Lösungsmittels einer Probe kein Rückstand mehr hinterblieb. Das neue Eluat wurde auf dem Wasserbad vorsichtig zur Trockene eingedampft, der schmutzig-weisse Rückstand in wenig Wasser gelöst und auf seine Wirksamkeit gegenüber Staph. aur. geprüft. Nach dem Bebrüten waren wiederum Höfe von über 4 cm Ø zu erkennen.

Die wässrige Lösung des schmutzig-weissen Rückstands wurde mit einigen Tropfen Eisenchloridlösung versetzt. Es entstand sofort eine blauschwarze Färbung. Da bei den papierchromatographischen Versuchen festgestellt worden war, dass es sich bei der gesuchten Substanz um einen phenolischen Körper handeln müsse, erschien es sicher, dass der grauweisse Rückstand der gesuchte Stoff sei und die gelbliche Färbung des zuerst aufgefangenen Eluats auf einer Verunreinigung beruhte.

Es wurde nun ein Chromatogramm des Rückstands angefertigt. Als Fliessmittel wurde wiederum das Partridgegemisch verwendet. Nach dem Trocknen des Chromatogramms wurde es unter kürzwelligem UV-Licht betrachtet. Es war ein dunkelviolett gefärbter Fleck sichtbar, der sich seinem R_F-Wert zufolge auch bei den früheren Versuchen als antibakteriell wirksam herausgestellt hatte, sowie direkt anschliessend ein schwacher hellblau gefärbter. Es lag also offensichtlich noch keine reine Substanz vor.

Da jetzt versucht werden musste, das gelbgefärbte Eluat von dem farblosen zu trennen, wurden im Gegensatz zu dem vorigen Versuch längere Glassäulen (30 cm Länge und 3 cm Durchmesser sowie später Säulen von 60 cm Länge und 4 cm Durchmesser) und ausschliesslich destilliertes Wasser zur Eluation verwendet. Dadurch wurde ein wesentlich langsa-

meres Durchlaufen und damit eine exaktere Trennung der einzelnen Zonen erreicht.

Mehrere Tage nach Beginn der Eluation wurde die wässrige Lösung wiederum gelb gefärbt. Bei der Betrachtung der Säule unter UV-Licht konnte einwandfrei beobachtet werden, dass sich die gesuchte dunkelviolette Schicht noch nicht am Säulenende befand. Es wurde nun so lange weiter eluiert, bis die unterste Grenze der violetten Schicht direkt am Säulenende lag und somit der Lösungsauslauf unmittelbar darauf erfolgen musste. Das vorher gelbbraun gefärbte Eluat war inzwischen wieder farblos geworden, so dass angenommen werden konnte, dass der verunreinigende Stoff bereits quantitativ ausgelaufen war.

Nachdem probeweise verdampfte Tropfen des Eluats einen schmutzig-weissen Rückstand hinterliessen, wurde die Lösung gesammelt.

Einige Tage später begannen sich die neuen Lösungen schwach gelb zu färben. Die Farbe ging im Lauf der nächsten Tage in eine dunkelbraune über. Da die Möglichkeit bestand, dass sich der gesuchte Stoff chemisch veränderte und dadurch eine Verringerung der antibakteriellen Wirkung eintrat, wurden ein Tropfen des frischen sowie ein Tropfen des einige Tage alten verfärbten Eluats auf eine beimpfte Agarschale gebracht und diese bebrütet. Nach 24 Stunden hatten sich zwei Höfe von 4,5 cm Ø gebildet, so dass also Grund zu der Annahme bestand, dass keine wesentliche qualitative Veränderung des Stoffes eingetreten war.

Beim vorsichtigen Abdampfen des Lösungsmittels verstärkte sich die gelbbraune Farbe. Da frühere Versuche gezeigt hatten, dass bei einer Entfärbung durch Aktivkohle der aktive Stoff ebenfalls adsorbiert worden war, konnte diese Methode der Entfärbung nicht verwendet werden. Da eine Gelbfärbung des Eluats auch bei Aufbewahrung im Kühlschrank auftrat, wurde später das Lösungsmittel sofort

nach dem Durchlauf abdestilliert und der Rückstand im Kühlschrank aufbewahrt.

7. Eluataufarbeitung

a) Lösungs- und Reinigungsversuche

Da später noch eine endgültige Reinigung und Umkristallisation erfolgen musste, wurden Lösungsversuche mit dem Eluatrückstand durchgeführt. In Äther und Wasser war die Substanz schwer, in Azeton, Methanol und Äthanol dagegen leicht löslich. In Chloroform konnte überhaupt keine Lösung beobachtet werden.

Bei diesen Proben fiel es auf, dass nach dem Auflösen der Substanz in Azeton dunkle Flocken ungelöst zurückblieben, die abfiltriert werden konnten. Trotzdem war nach dem Verdunsten des Lösungsmittels nach der Filtration keine sichtbare Reinigung erfolgt.

Da der Stoff in Äther schwer löslich war, wurde versucht, ihn aus der konzentrierten ätherischen Lösung umzukristallisieren. Dieses gelang weder bei Zimmer- noch bei Kühlschranktemperatur.

Bei weiteren Lösungsversuchen wurde festgestellt, dass sich die Substanz sowohl in Benzin als auch in Benzol schwer löste. Bei Abkühlen der erhitzten Lösung schieden sich aus den Lösungsmitteln wiederum die schmutzig-weissen Kristalle aus.

Der Eluatrückstand wurde nun in wenig Alkohol gelöst und darauf bis zur beginnenden Trübung Äther zugesetzt. Es entstanden dunkle Ausflockungen, die abfiltriert wurden. Nach längerer Zeit waren wiederum die unreinen Kristalle aus der Lösung ausgefallen bzw. hatten sich an der Glaswandung in Form von langen Nadeln auskristallisiert. Von diesen Nadeln wurde eine Probe auf ein feuchtes Fil-

terpapierscheibchen gewischt und gegen Staph. aur. geprüft. Parallel dazu wurden die vorher abfiltrierten dunklen Ausflockungen ebenfalls auf Filterpapier gegeben und unter den gleichen Bedingungen getestet. Nach eintägiger Bebrütung hatten sich auf den Agarschalen mit dem Ätherrückstand die üblichen Höfe von ca. 4 cm Ø gebildet, während auf den Schalen mit den Ausflockungen kein bzw. ein ganz minimaler Hof entstanden war.

Eine andere Probe der wirksamen Kristalle wurde in Äther heiss gelöst. Dann wurde zu dieser Lösung Chloroform gegeben. Es fiel sofort ein dicker Niederschlag aus. Beim Abkühlen sammelten sich auf dem Boden des Gefässes gelbliche Kristalle, während auf dem Chloroform reinweisse Kristalle schwammen. Beim weiteren Abkühlen sanken diese Kristalle zu Boden und vermengten sich mit den gelblichen. Die Kristalle wurden abfiltriert und der gesamte Vorgang wiederholt. Bei diesem und den folgenden Versuchen war keine optische Unterscheidung zwischen weissen und gelblichen Kristallen mehr zu erkennen, so dass diese Art der Reinigung aufgegeben wurde. Eine Umkristallisation in Dioxan gelang nicht, da der Stoff in dem Lösungsmittel sehr leicht löslich war.

Weiter wurde versucht, durch Ausschüttelung mit Bolus alba eine Reinigung der Kristalle zu erzielen: Der Eluatrückstand wurde in wenig Wasser gelöst, etwas weisser Ton hinzugegeben und diese Mischung kurze Zeit geschüttelt. Anschliessend wurde filtriert. Das Filtrat war vollkommen klar und farblos. Es wurde vorsichtig auf dem Wasserbad eingedampft. Dabei hinterblieb ein weisser Rückstand. Nach Auftropfen von etwas Azeton und Verdunsten des Lösungsmittels wurde er unter dem Mikroskop betrachtet. Es waren lange weisse Nadeln erkennbar. Sie wurden auf ein feuchtes Filterpapier gewischt und dieses auf eine beimpfte Agarschale gelegt. Nach eintägiger Bebrütung waren Höfe von 4,5 cm Ø erkennbar.

Als Parallelversuch wurde in gleicher Art eine Reinigung mit Talcum versucht. Auch hier hinterblieb nach dem Schütteln, Filtrieren und Eindampfen des Filtrats ein weisser Rückstand, der ebenfalls gegen Staph. aur. Höfe in der gleichen Grössenordnung wie bei dem Versuch mit Bolus alba ergab.

Von den beim ersten Versuch durch Ausschüttelung mit weissem Ton erhaltenen reinweissen Kristallen wurde der Schmelzpunkt bestimmt. Auf einem Koflerblock wurden einige Kristalle langsam erhitzt. Dabei begann die Substanz bei 190° C zu schmelzen. Dieser Prozess zog sich bis zu 240° C hin. Damit war eindeutig bewiesen, dass die Substanz noch stark verunreinigt war.

Da parallele Schmelzpunktsversuche mit Kristallen, die sich nach dem Lösen des Eluatrückstands in Methanol und langsamen Verdunsten des Lösungsmittels an der Glaswandung niedergeschlagen hatten, einen engeren Schmelzpunktsintervall (190 - 215° C) ergaben und damit offensichtlich ein Fortschritt in der Reinigung des unbekannten Stoffes erzielt worden war, wurde der Weg der Tonausschüttelung nicht weiter verfolgt.

Nachdem durch wiederholtes Lösen des Eluatrückstands in Methanol, teilweises Verdunsten des Alkohols und Abkratzen der Kristalle von der Glaswand eine grössere Menge von Substanz gewonnen worden war, wurde sie mit wenig Wasser übergossen und zur Kristallbildung in einem offenen Gefäss in den Kühlschrank gestellt. Nach einigen Tagen hatten sich auf dem Boden des Gefässes wiederum weisse nadelförmige Kristalle gebildet, während die darüber befindliche Flüssigkeit dunkel gefärbt war. Die Kristalle wurden abfiltriert und der Umkristallisationsvorgang wiederholt. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen wurde nochmals der Schmelzpunkt bestimmt.

Diesmal zog sich der Intervall von 203 - 217° C hin.

Obwohl die Ausbeute der Substanz gering war, erschien diese Art der Reinigung möglich. Nach nochmaliger Umkristallisation und Trocknung wurde der Rückstand auf ein feuchtes Filterpapier gewischt und auf seine bakterienhemmende Wirkung geprüft. Nach eintägiger Bebrütung hatte sich um das Filter überhaupt kein Hof gebildet!

Dieses negative Ergebnis bewies, dass als wirksamer Stoff die Substanz in Frage kam, die zuvor als Verunreinigung angesehen worden war.

b) Sublimation

Als nächstes wurde eine Reinigung des Eluats durch Sublimation versucht. Wenig Rückstand wurde in einer feuerfesten Glasschale erhitzt und über die Schale eine durch Auflegen von feuchter Watte gekühlte Glasscheibe gelegt. Es bildeten sich unter dem Mikroskop gut erkennbare lange weisse Nadeln. Diese Kristalle wurden auf ihre bakterienhemmende Wirkung geprüft. Sie ergaben nach der Bebrütung Höfe von 5 cm Ø. Da dieses Verfahren erfolgreich zu sein schien, wurde eine grössere Menge Sublimat in einer speziellen Sublimationsapparatur hergestellt. Bei 215° C schieden sich grosse Bündel von langen weissen nadelförmigen Kristallen ab, die z.T. jedoch bräunlich gefärbt waren. Sie wurden von der Glaswand abgekratzt und in heissem Xylol gelöst. Die Lösung wurde zur Auskristallisation in den Kühlschrank gestellt. Kurze Zeit später begannen sich reinweisse Kristalle am Boden des Gefässes zu sammeln. Nach eintägigem Stehenlassen wurden die Kristalle abfiltriert, getrocknet und gegen Staph. aur. getestet. Ein Hof von 4,5 cm Ø bewies, dass sich Xylol sehr gut als Umkristallisationsmittel eignete.

Sublimationsversuche mit dem Ätherrückstand führten zu dem Ergebnis, dass sich ebenfalls bräunliche Nadeln bildeten, die jedoch auch trotz öfteren Umkristallisierens mit Xylol ihre rötlich-braune Farbe behielten. Auch diese Kri-

stalle bewirkten gegen Staph. aur. einen Hemmhof von 5 cm Ø. Bei einer anschliessenden papierchromatographischen Reinheitsuntersuchung (Fliessmittel = Partridgegemisch) zeigte es sich jedoch, dass unter UV-Licht drei Flecken erkennbar waren (R_F = 0,31; 0,64; 0,73) und somit keine einheitliche Substanz vorlag. Ein Parallelchromatogramm mit dem Sublimat des Eluatrückstands zeigte nur einen einzigen Fleck mit einem R_F-Wert von 0,73. Demnach konnte auf die säulenchromatographische Trennung nicht verzichtet werden.

8. Identifizierung des Sublimats

Von einer Probe des Sublimats wurde der Schmelzpunkt auf dem Koflerblock bestimmt. Er betrug bei mehreren Messungen exakt 131,5° C.

Als Phenol, das diesem Wert am nächsten lag, kam Pyrogallol mit 133° C in Frage. Es wurde der Mischschmelzpunkt des Sublimats mit reinem Pyrogallol hergestellt. Er betrug 132,5° C.

Dieses positive Ergebnis wurde durch chemische Identitätsreaktionen des Sublimats auf Pyrogallol erhärtet. Die Versuche wurden in doppelter Ausführung durchgeführt, und zwar einmal mit dem Sublimat und das andere Mal mit reinem Pyrogallol als Vergleichssubstanz.

Probe 1: Wässrige und $HgCl_2$-Lösungen wurden gemischt. Nach kurzer Zeit trat eine weisse Ausflockung auf. Durch Zusatz von NaOH färbte sie sich schwarz.

Probe 2: Zu der wässrigen Lösung wurde $AgNO_3$-Lösung gegeben. Sie wurde sofort schwarz gefärbt.

Probe 3: Nach Zugabe einiger Tropfen NaOH-Lösung trat eine Verfärbung von gelb nach dunkelbraun ein.

Probe 4: Zu der wässrigen Lösung wurden wenig CH_3COOH und ein Tropfen $FeCl_3$-Lösung gegeben. Sie färbte sich dunkelviolett.

Probe 5: Die Zugabe von Eisensulfat bewirkte eine helle Blaufärbung.

Probe 6: Nach Zugabe von Jodtinktur trat eine schöne purpurrote Färbung auf.

In sämtlichen Fällen verliefen die Reaktionen der beiden Substanzen gleich.

Vergleichspapierchromatogramme zeigten in beiden Fällen den gleichen R_F-Wert von 0,73, Partridgegemisch als Fliessmittel. Damit konnte eindeutig gesagt werden, dass es sich bei dem Sublimat um Pyrogallol handelte.

Da bei einem Sublimationsprozess tiefgehende chemische Veränderungen vonstatten gehen können, musste nachgewiesen werden, dass das Pyrogallol identisch mit der ursprünglich im Pflanzenextrakt antibakteriell wirkenden Substanz war. Als geeignetste Methode kam hierbei ein papierchromatographischer Vergleich in Frage. Eluat- und Pyrogallollösungen wurden nebeneinander auf Chromatogrammpapier getropft und das Chromatogramm in 2 %iger Essigsäure entwickelt. Nach dem Trocknen wurden die R_F-Werte der beiden Substanzen gemessen. Sie betrugen für die wirksame Substanz im Eluat 0,37 und für Pyrogallol 0,7. Damit war bewiesen, dass Pyrogallol nicht genuin in den Bärentraubenblättern vorkam und offenbar durch den Sublimationsprozess entstanden war.

9. Identifizierung des genuinen in vitro antibakteriellen Prinzips

Da Pyrogallol technisch aus Gallussäure gewonnen wird, diese wiederum in den Folia Uvae ursi enthalten ist, ergab sich nun die Vermutung, dass die in vitro bakteriostatisch wirksame Substanz die Gallussäure war.

Um diese Vermutung zu beweisen, wurden Vergleichschromatogramme von reiner Gallussäure und dem Eluat hergestellt. Als Fliessmittel wurden 2 %ige Essigsäure und Partridgegemisch benutzt. Nach dem Trocknen hatten beide Substanzen auf beiden Chromatogrammen den gleichen R_F-Wert.

Es wurden weitere Identitätsreaktionen des Eluats auf Gallussäure durchgeführt:

Probe 1: Mit Salpetersäure wurde eine gelbliche Färbung beobachtet, die in Braun überging.

Probe 2: Nach Schütteln mit Natriumkarbonat trat eine grüne Farbe auf. Die Farbe veränderte sich nicht.

Probe 3: Nach Zugabe von Eisenchlorid und Kaliumferricyanid entstand eine Färbung von Berlinerblau.

Nachdem die antibakteriell wirksame Substanz einwandfrei als Gallussäure identifiziert worden war, wurde nochmals ein Papierchromatogramm des wässrigen Extrakts der Folia Uvae ursi angefertigt, um festzustellen, ob es sich bei der Gallussäure um den einzigen in vitro bakteriostatischen Inhaltsstoff der Bärentraubenblätter handelte.

Nach Auftragung verhältnismässig grosser Mengen von der Teeabkochung (0,1 und 0,2 ccm) und Entwicklung in 2 %iger Essigsäure wurde das Chromatogramm in 1 cm lange Streifen zerschnitten und diese nach dem Befeuchten mit Wasser auf beimpfte Agarplatten gelegt. Nach der Bebrütung stellte es sich heraus, dass ausser um den üblichen Gallussäurefleck um den Streifen, auf dem der R_F-Nullpunkt lag, ebenfalls ein keimfreier Hof entstanden war, allerdings mit geringerem Hofdurchmesser. Dieses Ergebnis war erwartet worden, da als Inhaltsstoffe der Folia Uvae ursi Gerbstoffe (S. 23) angegeben werden und Herrmann[56] nachweisen konnte, dass das Tannin der Bärentraubenblät-

ter nach Hydrolyse neben Ellagsäure und Glukose zu etwa 85 % aus Gallussäure besteht. Es bestand also von vornherein der Verdacht, dass es sich bei diesem zweiten Stoff um den Gerbstoff bzw. die darin enthaltene Gallussäure handelte.

Als Blindversuch wurde eine wässrige Lösung von Tannin DAB VI hergestellt, das nach Herrmann die nahezu gleiche prozentuale Zusammensetzung wie das Tannin der Folia Uvae ursi hat, und diese gegen Staph. aur. getestet. Nach 24stündiger Bebrütung hatten sich um das mit der Lösung getränkte Filterpapier Höfe von 3,5 bis 4 cm Ø gebildet. Damit war also eine grundsätzliche bakteriostatische Wirksamkeit des Tannins bewiesen.

Von einer halbstündigen Abkochung der Bärentraubenblätter wurde nach der Filtration durch Watte eine zweistündige Hydrolyse mit 5 %iger Salzsäure am Rückflusskühler hergestellt. Einige Tropfen der Lösung wurden auf ein Chromatogramm aufgetragen und dieses in 2 %iger Essigsäure entwickelt. Nach dem Trocknen wurde der vor der Hydrolyse bei anderen Versuchen wirksame Fleck auf der Startlinie ausgeschnitten, mit etwas Wasser befeuchtet und auf eine beimpfte Agarschale gelegt. Nach eintägiger Bebrütung hatte sich um das Filter überhaupt kein Hof gebildet.

Die Betrachtung des restlichen Chromatogramms unter kurzwelligem UV-Licht zeigte dagegen eine wesentliche Vergrösserung des violetten Flecks, der als Gallussäure identifiziert worden war.

Auch die übrigen Flecken des Chromatogramms wurden ausgeschnitten und auf die eben beschriebene Art gegen Staph. aur. geprüft. Da ausser dem Gallussäurefleck kein anderer eine bakteriostatische Wirkung aufwies, konnte mit Sicherheit gesagt werden, dass als alleiniger in vitro antibakteriell wirksamer Inhaltsstoff des Bärentraubenblättertees die Gallussäure, und zwar rein bzw. als Tannin, in Betracht kam.

10. Nachweis der bakteriostatisch wirksamen Substanz nach Körperpassage

Es ergab sich nun die Frage, ob Gallussäure nach oraler Verabreichung in den Harn übergeht und dort unter Umständen einen antiseptischen Effekt entfalten kann, oder ob der menschliche Organismus die Säure durch Kopplung an Glucuronsäure entgiftet und sie als Glucuronid ausscheidet.

Weiter interessierte die Frage, ob das Tannin während der Körperpassage gespalten wird, wobei Gallussäure aus dem Tanninmolekül frei gemacht wird und damit ebenfalls eine antibakterielle Wirkung entfalten kann.

Blumenberg und Dohrmann[57] geben einige Autoren an, die nach der Eingabe von Gallussäure diese in ihrer freien Form im Harn nachweisen konnten. Sie selbst beobachteten auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen von Kaninchenharn nach Eingabe von Gallussäure sowohl freie Säure als auch eine starke Vermehrung von Glucuronsäure.

Über die Frage der Ausscheidung bzw. Spaltung von Tannin wird berichtet, dass im Harn nach oraler Applikation Gallussäure nachgewiesen werden kann[58,59,60] allerdings nur in verhältnismässig geringen Mengen[61,62].

Das Ergebnis der Literaturhinweise machte eigene Untersuchungen in dieser Hinsicht notwendig.

a) Tierversuche

Die Versuche von Blumenberg und Dohrmann wurden am Institut für Tierzucht der Freien Universität Berlin mit fünf Kaninchen wiederholt. Den einzelnen Tieren wurden unterschiedliche Mengen von Gallussäure, und zwar 0,1, 0,25 und 0,5 g, in wässrigen Lösungen durch Schlundsonden zugeführt. Diese Prozesse wurden zweimal täglich zwei Tage lang durchgeführt. Der Harn wurde aufgefangen, fünfmal fünf Minuten mit Essigester ausgeschüttelt, die Ausschüttelungen der einzelnen Konzentrationen vereinigt, mit getrocknetem Natriumsulfat entwässert, filtriert und die

Lösung durch teilweises Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum konzentriert. Anschliessend wurden 0,05 ccm der Lösungen auf ein Chromatogramm getropft und neben Gallussäurelösung als Blindsubstanz in 2 %iger Essigsäure entwickelt. Nach dem Trocknen waren unter kurzwelligem UV-Licht deutlich Gallussäureflecken, die aus dem Kaninchenharn stammten, erkennbar.

b) Selbstversuch

Da der Tierversuch positiv verlaufen war, wurde er im Selbstversuch wiederholt. 0,5 g Gallussäure wurde in 50 ccm Wasser heiss gelöst und die Lösung nüchtern getrunken. Kurz vor sowie vier, acht und zwölf Stunden nach der Einnahme wurde der Harn gesammelt. In der Zwischenzeit wurden ausser Wasser keine Flüssigkeit sowie keine gerbstoffhaltigen Speisen eingenommen.

Die Harnmengen wurden getrennt fünfmal 5 Minuten mit Essigester ausgeschüttelt, ebenfalls mit Natrium sulfuricum sicc. getrocknet, filtriert und die Lösungen im Vakuum eingeengt. Anschliessend wurden die Lösungen nebeneinander (Gallussäure als Vergleichssubstanz) mit 2 %iger Essigsäure chromatographiert. Nach dem Trocknen war unter kurzwelligem UV-Licht deutlich ein Gallussäurefleck in der zweiten Ausschüttelung (= vier Stunden nach der Einnahme) erkennbar. Dieser Fleck fehlte bei den Ausschüttelungen vor bzw. acht und zwölf Stunden nach der Einnahme.

Von der zweiten Ausschüttelung wurde ein neues Chromatogramm in zweidimensionaler Ausführung angefertigt. Die erste Phase (Abb. 4, I - S. 56) lief wiederum in 2 %iger Essigsäure, die zweite (Abb. 4, II - S. 56) in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5). Bei der Entwicklung der zweiten Phase wurde Gallussäure als Vergleichssubstanz aufgetragen. Ein nochmaliger Vergleich mit der Blindsubstanz zeigte eindeutig das Vorhandensein von Gallussäure im Harn (s. Abb. 4, S. 56).

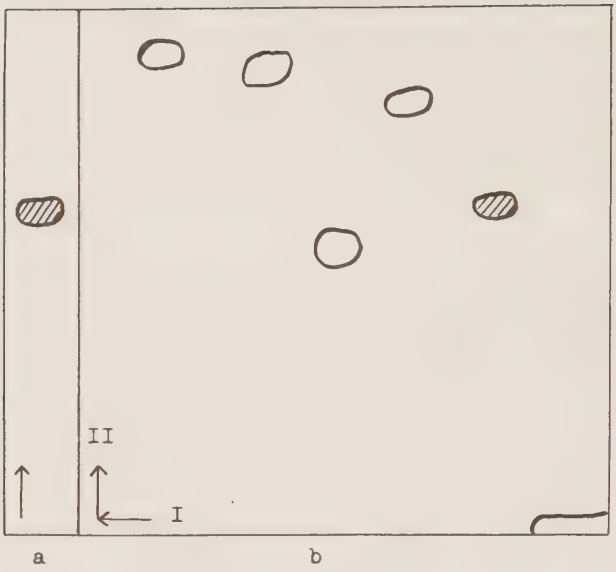


Abbildung 4

a = Vergleichschromatogramm der Gallussäure
b = Chromatogramm der Harnausschüttelung
(Gallussäure gestrichelt)

11. Nachweis der in vitro bakteriostatischen Substanz aus den Folia Uvae ursi nach Körperpassage im Selbstversuch

a) Qualitative Bestimmung

Es bestand nun die Notwendigkeit, im Selbstversuch zu klären, ob nach Einnahme von Bärentraubenblättertee im Harn ebenfalls Gallussäure nachzuweisen ist.

5,0 g Tee wurden eine halbe Stunde mit 100 ccm Wasser gekocht, filtriert und das Filtrat getrunken. Diese Ein-

nahme wurde dreimal täglich drei Tage lang durchgeführt. Vor der ersten sowie jeweils vor den anderen Einnahmen wurden der Harn gesondert gesammelt und die Menge quantitativ bestimmt. Während der drei Tage wurde auf gerbstoffhaltige Getränke (Kaffee und Tee) und Speisen verzichtet. Nach jeder Entnahme wurde der Harn sofort fünfmal mit Essigester fünf Minuten lang ausgeschüttelt und die Ausschüttelungen nach dem Trocknen und Filtrieren auf 30 ccm eingeengt. Die Essigesterlösungen wurden neben Gallussäurelösungen in steigenden Konzentrationen (0,05 bis 0,1 ccm) auf Chromatogrammpapier getropft und in 2 %iger Essigsäure entwickelt. Unter kurzwelligem UV-Licht waren bei gleichem R_F-Wert wie Gallussäure schwach violett gefärbte Flecken erkennbar, die nach Besprühen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung schwach bräunlich gefärbt wurden. Diese Flecke traten bei der Ausschüttelung vor der Einnahme überhaupt nicht, nach der ersten Einnahme stärker und nach den anderen schwächer auf.

b) Quantitative Bestimmung

Da die Färbungen nach dem Besprühen mit dem Reagens verhältnismässig schwach waren, bei Blindversuchen mit Gallussäure dagegen immer braunschwarze Flecke auftraten, wurden Gallussäurelösungen in steigenden Verdünnungen hergestellt, um anhand eines Vergleichs der Farbintensitäten auf die ungefähre Konzentration der Säure im Harn schliessen zu können.

Während 0,1 ccm einer Lösung von 15 γ in 10 ccm Wasser unter kurzwelligem UV-Licht noch gerade erkennbar waren, war die Methode der Besprühung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung wesentlich unempfindlicher: 0,1 ccm einer Lösung von 240 γ wurde minimal gelblich, die gleiche Menge einer Lösung von 490 γ in 10 ccm Wasser stärker gelblich gefärbt. Mit steigenden Konzentrationen gingen die

Farben über dunkelgelb, gelbbraun, braun nach braunschwarz über.

Die Farbskala wurde mit der Farbintensität des Gallussäureflecks aus der Harnausschüttelung nach dem Besprühen mit dem Reagens bei einer Verwendung von 0,05 ccm Essigesterlösung verglichen. Sie entsprach etwa der Färbung einer Lösung von 1,95 mg Gallussäure in 10 ccm Wasser.

Berechnung:

1) Vergleichssubstanz: In 10 ccm Wasser waren 490 γ Gallussäure gelöst.
   In 0,1 ccm aufgetropfter Lösung waren 4,9 γ Gallussäure enthalten.

2) Teesubstanz: In 0,05 ccm Essigesterlösung waren infolge gleicher Farbintensität ca. 4,9 γ Gallussäure enthalten.
   In 30 ccm Essigesterlösung als Gesamtextrakt der Harnausschüttelung waren demnach 3 mg Gallussäure enthalten.

Da die Gesamtmenge des Harns nach der ersten Eingabe, bei dem die grösste Konzentration an Gallussäure zu verzeichnen war, 300 ccm betrug, lag also eine Lösung von 3 mg Gallussäure in 300 ccm Lösungsmittel vor, was einer Konzentration von 0,01 °/oo entsprach.

12. Quantitative Bestimmung der wirksamen Substanz in den Folia Uvae ursi

a) Methode

Nachdem als in vitro bakteriostatischer Inhaltsstoff der Folia Uvae ursi die Gallussäure identifiziert und ihr qualitativer und ungefährer quantitativer Nachweis nach oraler Applikation aus dem Harn erbracht worden war, musste festgestellt werden, ob durch Verwendung verschiedener

Sorten von Bärentraubenblättertee infolge von schwankendem Prozentgehalt der Gallussäure in der Droge die ausgeschiedene Menge der Säure differieren und somit eventuell eine bakteriostatische Wirkung intensiviert werden konnte.

Als geeignetste Methode der quantitativen Bestimmung erschienen die Auftrennung der Inhaltsstoffe des Tees auf papierchromatographischem Wege und anschliessende quantitative Bestimmung aus den Chromatogrammen.

Cramer[63] beschreibt als Möglichkeiten den Vergleich der Fleckengrösse der unbekannten Substanz mit einer Reihe von quantitativ bekannten Lösungen, das Wiegen eines Papierstückes mit Fleck im Verhältnis zu einem gleich grossen Papierstück als Vergleich oder aber photometrische Messungen der unbekannten Lösung mit quantitativ bekannten. Bei der letzten Methode sind zu den Lösungen Reagenzien zu geben, die eine Färbung der Lösung hervorrufen. Die Farbintensität wird darauf photometrisch erfasst und mit bekannten Lösungen verglichen.

b) Experimenteller Nachweis

Da bei den ersten beiden Methoden die Fehlergrenze zu gross ist, wurde versucht, die letzte anzuwenden. Es wurde eine Gallussäurelösung hergestellt und diese einmal mit Eisen-3-chlorid-, das andere Mal mit Kaliumhydroxydlösung versetzt. Da die eingetretenen Farbveränderungen sehr schnell an Intensität verloren, konnte dieser Weg der Gehaltsbestimmung nicht beschritten werden.

Eine weitere Möglichkeit bestand in der Messung des UV-Spektrums. Zu diesem Zweck wurden Gallussäurelösungen, die später als Vergleichslösungen dienen sollten, in folgenden Konzentrationen hergestellt:

Lösung 1: 1000 γ Gallussäure in 100 ccm H_2O
Lösung 2: 750 γ " " " " "
Lösung 3: 500 γ " " " " "
Lösung 4: 250 γ " " " " "

Von jeder Lösung wurden drei verschiedene Messungen des UV-Spektrums hergestellt. Abbildung 5 (S. 61) zeigt die abgelesenen mittleren Werte der vier verschiedenen Lösungen in Form von Kurven.

Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Minima und Maxima stets bei der gleichen Wellenlänge lagen. Sie hatten folgende Werte:

Lösung	Minima	Maxima
1	λ = 237; log ε = 0,184	λ = 262; log ε = 0,450
2	λ = 237; log ε = 0,130	λ = 262; log ε = 0,330
3	λ = 237; log ε = 0,096	λ = 262; log ε = 0,222
4	λ = 237; log ε = 0,063	λ = 262; log ε = 0,118

Tabelle 2

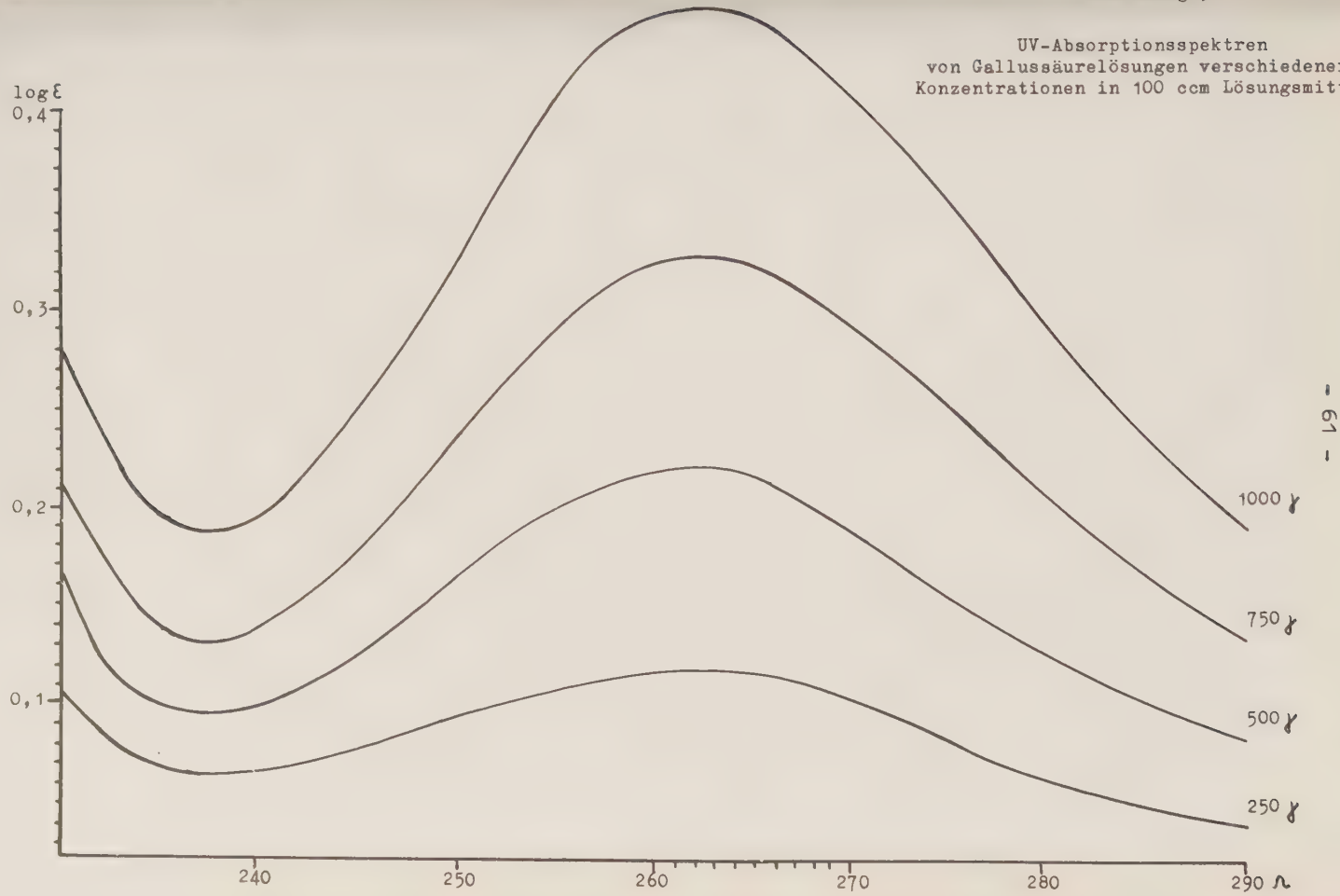
Es bestand nun die Möglichkeit, die Maxima auf ein Koordinatensystem aufzutragen und die Punkte in Form einer Geraden miteinander zu verbinden (Abb. 6 S. 62). Bei der späteren quantitativen Bestimmung der Gallussäure aus dem Bärentraubenblättertee brauchten also die erhaltenen Maximawerte nur auf der Geraden bestimmt und dann die praktischen Werte abgelesen zu werden.

Die Konzentrationsgerade musste nun noch auf ihre Gültigkeit auch gegenüber Chromatogramm-Elutionen geprüft werden, da die Möglichkeit bestand, dass während des Laufprozesses ein Teil des gelösten Stoffes an der Wegstrecke hängengeblieben war.

Es wurden eine 1 %ige, 0,75, 0,5 und eine 0,25 prozentige Gallussäurelösung hergestellt und von diesen Lösungen je 0,1 ccm auf ein Papierchromatogramm gebracht. Die Chromatogramme liefen in 2 %iger Essigsäure bis zu einer Höhe von 25 cm von der Startlinie aus gemessen. Nach dem Trocknen wurden die unter kurzwelligem UV-Licht sichtba-

Abbildung 5

UV-Absorptionsspektren
von Gallussäurelösungen verschiedener
Konzentrationen in 100 ccm Lösungsmittel



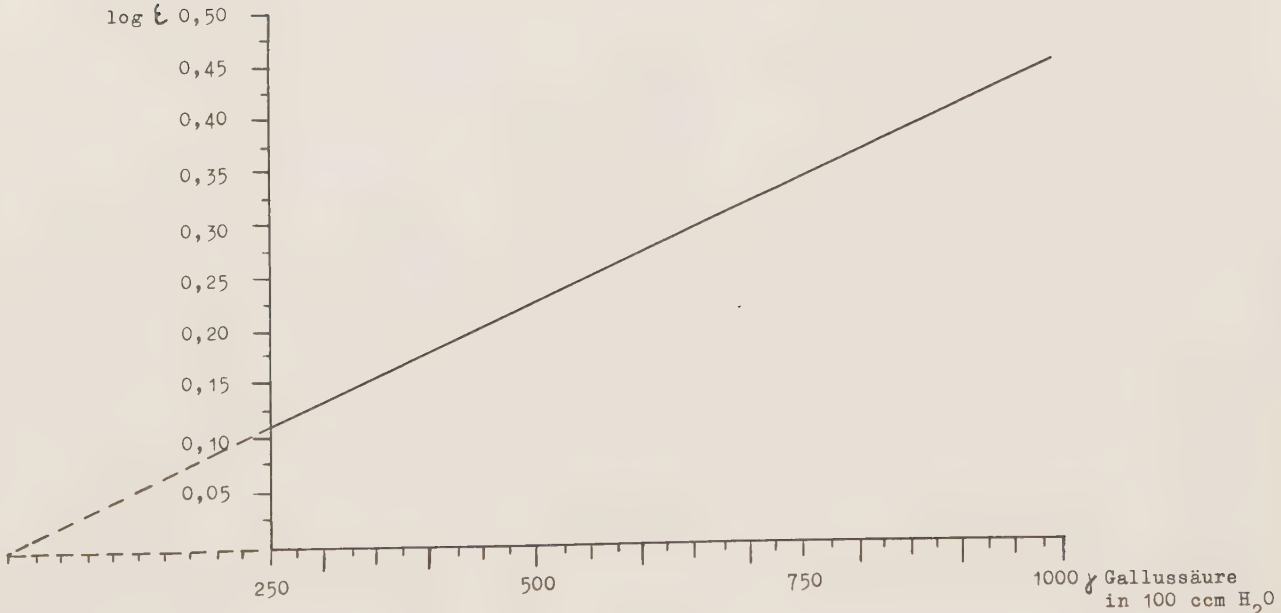


Abbildung 6

Maxima der UV-Absorptionsspektren von Gallussäurelösungen verschiedener Konzentrationen

ren violetten Flecke ausgeschnitten, auf ein Stativ gehängt und mittels einer Kapillare mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Die Lösung wurde in einem darunterstehenden Messkolben von 100 ccm aufgefangen. Die so erhaltenen Lösungen entsprachen in ihren Konzentrationen denen der obigen Versuche. Bei den anschliessenden UV-Messungen wurden folgende Werte abgelesen:

Lösung	Maxima	log
1 %	λ = 262	ε = 0,420
0,75 %	λ = 262	ε = 0,320
0,50 %	λ = 262	ε = 0,207
0,25 %	λ = 262	ε = 0,112

Tabelle 3

Diese Ergebnisse lagen im Vergleich zu den Werten, die durch Messung der Lösungen ohne chromatographische Behandlung ermittelt worden waren, im Durchschnitt ca. 5 % niedriger. Bei den folgenden quantitativen Messungen der Gallussäure aus dem Bärentraubenblättertee mussten diese 5 % also dem Ergebnis zugeschlagen werden.

Im Folgenden wurde die quantitative Bestimmung der Gallussäure in den Folia Uvae ursi durchgeführt. Es wurde von der in der Praxis üblicherweise pro Abkochung verwendeten Menge von 5,0 g geschnittener Droge ausgegangen. Die abgewogene Teemenge wurde mit 75 ccm Wasser übergossen und bei kleiner Flamme 1/2 Stunde gekocht. Anschliessend wurde durch Watte filtriert, die Lösung genau auf 50 ccm mit Wasser aufgefüllt und 0,05 ccm noch heisser Tee auf die Startlinie eines Chromatogramms gebracht. Im Gegensatz zu den vorherigen Proben wurden nicht 0,1 ccm aufgetropft, da mit möglichst geringen Mengen gearbeitet werden musste, um eine gute Trennung der einzelnen Flecke zu erreichen.

Anschliessend wurde das Chromatogramm in 2 %iger Essigsäure bis zu einer Höhe von 25 cm von der Startlinie aus entwickelt. Nach dem Trocknen wurden unter kurzwelligem UV-Licht die violetten Gallussäureflecken ausgeschnitten, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass angrenzende Flecken quantitativ ausgeschaltet wurden. Da dies nicht immer vollkommen gelang, wurden von jeder Fraktion mehrere Proben durchgeführt. Die qualitativ völlig reine Substanzlösung war bei der Messung daran zu erkennen, dass die Minima genau bei λ = 237 und die Maxima bei λ = 262 lagen und so mit den bei den Blindproben erhaltenen Werten der Wellenlängen übereinstimmten.

Dann wurden die Chromatogrammflecken parallel zu den Vergleichsversuchen mit der reinen Gallussäure mittels einer Kanüle eluiert. Das Eluat tropfte in darunterstehende Messkolben von 25 ccm, da in einem besonderen vorhergehenden Versuch festgestellt worden war, dass bei einer Verdünnung mit 100 ccm Wasser die UV-Werte zu niedrig lagen und damit zu ungenau waren.

Da angenommen werden musste, dass die Gallussäurekonzentration in den Folia Uvae ursi bei den einzelnen Sorten schwankte, wurden auf die eben beschriebene Art nebeneinander folgende vier Teesorten untersucht:

Folia Uvae ursi, geliefert von der Chemischen Fabrik Tempelhof, Berlin,
Folia Uvae ursi, spanische Ware, normal,
Folia Uvae ursi, spanische Ware, besonders handverlesen,
Folia Uvae ursi, jugoslawische Ware.

Es war festgestellt worden, dass nach oraler Applikation von Tannin im Harn nur noch geringe Mengen von Gallussäure nachzuweisen waren (S. 54). Es bestand also die Notwendigkeit, ausser der freien auch die Gesamtgal-

lussäuremenge in den Bärentraubenblättern zu bestimmen. Diese Bestimmung erfolgte durch Hydrolyse des Tees: Je 5,0 g der vier verschiedenen Teesorten wurden mit 75 ccm Wasser übergossen, 1/2 Stunde gekocht, die Abkochungen durch Watte filtriert und das Volumen durch Wasserzugabe auf je 45 ccm gebracht. Nach Zugabe von je 5 ccm 5%iger Salzsäure wurde die Gesamtmenge jeder Probe wie bei den vorigen Versuchen auf 50 ccm gebracht. Die vier Auszüge wurden nun jeweils 2 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Ein Vorversuch hatte gezeigt, dass diese Zeit ausreichte, um den vorher bakterienhemmenden Fleck auf der Startlinie der Papierchromatogramme zu inaktivieren bzw. die Substanz zu spalten. Danach wurden von den hydrolysierten Lösungen ebenfalls je 0,05 ccm auf die Startlinie von Chromatogrammen gebracht und diese bis zu einer Höhe von 25 cm in 2 %iger Essigsäure entwickelt. Nach dem Ausschneiden der Flecke wurden sie auf die vorher beschriebene Art mit Wasser in 25 ccm Messkolben eluiert.

Die anschliessenden UV-Untersuchungen zeigten deutliche Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Sorten als auch zwischen einfacher und hydrolysierter Abkochung.

Um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten, wurden von jeder einzelnen Untersuchung drei verschiedene Proben durchgeführt. Bei den Messergebnissen der drei Proben, die nur ganz minimal voneinander abwichen, wurde das Mittel genommen.

Die Messungen der UV-Maxima ergaben folgende Werte:

Ware	Tee	Tee Hydrolyse
Chem.Fabrik Tempelhof	log ε = 0,122	log ε = 0,188
Spanische Ware normal	log ε = 0,130	log ε = 0,137
Spanische Ware verles.	log ε = 0,041	log ε = 0,520
Jugoslawische Ware	log ε = 0,052	log ε = 0,170

Tabelle 4

Nach Aufschlag von 5 %, die - wie oben angegeben - als auf der Wegstrecke hängengeblieben anzusehen waren, wurden die endgültigen Werte der Gallussäurekonzentrationen erhalten, die nun auf der Geraden, die durch Messung mehrerer bekannter quantitativer Lösungen aufgestellt worden war (S. 62), abgelesen werden konnten (Tabelle 5).

Ware	Tee	Tee Hydrolyse
Chemische Fabrik Tempelhof	285 γ	440 γ
Spanische Ware normal	300 γ	325 γ
Spanische Ware verlesen	95 γ	1220 γ
Jugoslawische Ware	115 γ	405 γ

Tabelle 5

Diese Ergebnisse mussten durch 4 geteilt werden, da bei der Aufstellung der Bezugsgeraden eine Lösung in 100 ccm Wasser und nicht in 25 ccm vorgelegen hatte.

Es ergaben sich folgende Werte der Gallussäurekonzentration pro 0,05 ccm einer Lösung in 100 ccm Wasser in den vier verschiedenen Teesorten:

Ware	Tee	Tee Hydrolyse
Chemische Fabrik Tempelhof	71 γ	110 γ
Spanische Ware normal	75 γ	81 γ
Spanische Ware verlesen	24 γ	305 γ
Jugoslawische Ware	29 γ	101 γ

Tabelle 6

Die prozentuale Umrechnung der in 100 g Bärentraubenblättertee enthaltenen Gallussäure erfolgte nach folgendem Schema: In 50 ccm Wasser waren die Wirkstoffe von 5,0 g Tee enthalten. In der auf das Chromatogramm aufgetropften Lösung waren demnach die Wirkstoffe von 0,005 g Tee enthalten. Die in 0,005 g Tee enthaltene Gallussäuremenge entsprach nach photometrischem Vergleich mit einer

bekannten Lösung x γ Gallussäure. Durch Multiplikation mit 20 000 (= 100 g Tee) wurden folgende Gallussäure-Werte in Prozenten erhalten:

Ware	Tee	Tee Hydrolyse
Chemische Fabrik Tempelhof	1,4 %	2,2 %
Spanische Ware normal	1,5 %	1,6 %
Spanische Ware verlesen	0,5 %	6,1 %
Jugoslawische Ware	0,6 %	2,0 %

Tabelle 7

Diese Werte zeigen nicht die Gesamtmenge an Gallussäure in freier (= Tee) bzw. in an Tannin gebundener (= Tee Hydrolyse) Form in den Folia Uvae ursi an, sondern die in der Praxis pro einmaliger Abkochung dem Organismus zugeführte Menge in 100 g Tee!

Da die im Selbstversuch verwendete Droge der Chemischen Fabrik Tempelhof einen überdurchschnittlichen Gehalt an Gallussäure aufwies, konnte die im Harn nachgewiesene Menge an Säure (0,01 °/oo) ebenfalls als optimal angesehen werden.

13. Nachweis der Wirksamkeit der Gallussäure auf verschiedene Keime

Es musste als nächstes festgestellt werden, welche der bei Blasen- und Nierenerkrankungen vorkommenden Keime durch Gallussäure in ihrem Wachstum gehemmt werden und wie gross die Gallussäurekonzentration sein muss, um noch eine Hemmung bewirken zu können.

Walter und Heilmeyer[64] führen eine Anzahl von Erregern bei Infektionen des Urogenitaltraktes auf, von denen folgende Stämme untersucht wurden:

Proteus vulgaris,

Escherichia coli,

Aerobacter aerogenes,

Pseudomonas pyoceanea,

Klebsiella pneumoniae,

Micrococcus pyogenes var. aureus (Staphylococcus aureus) Stamm SG 511, Jena,

Micrococcus pyogenes var. aureus Stamm SG 511 Berlin,

Streptococcus faecalis,

Micrococcus pyogenes var. albus,

Corynebacterium pseudodiphtheriticum,

Diplococcus pneumoniae,

Streptococcus pyogenes.

Die Ermittlung der notwendigen Verdünnungen wurde experimentell so durchgeführt, dass nach Ausspatelung von 0,1 ccm einer Verdünnungsreihe nach 24 stündiger Bebrütung ein schwacher Rasen die Agarschicht bedeckte. Es wurden folgende Nährböden und Verdünnungen verwendet:

Stamm	Nährboden	Verdünnung
Proteus vulg.	Normal-Agar	1 : 1 000
Escher. coli	"	1 : 10 000
Aerobacter aerog.	"	1 : 10 000
Pseudom. pyocean.	"	1 : 10 000
Klebs. pneumon.	"	1 : 10 000
Staph. aur. Jena	"	1 : 100 000
Staph. aur. Berlin	"	1 : 100 000
Strept. faecal.	Blutagar	1 : 1 000
Microc. albus	"	1 : 1 000
Coryn. pseudodiphth.	"	1 : 100
Diploc. pneumon.	"	1 : 1
Strept. pyogen.	"	1 : 1

Tabelle 8

Die folgenden Versuche wurden so durchgeführt, dass nach der Ausspatelung von 0,1 ccm der jeweiligen Verdünnung auf den Agar in der Mitte der Schale ein Papierfilter mit einem Durchmesser von 1,1 cm gelegt und auf die-

ses 0,1 ccm einer Gallussäurelösung verschiedener Konzentrationen getropft wurden:

1000 γ	in	0,1	ccm	Lösung
750 γ	"	0,1	"	"
500 γ	"	0,1	"	"
250 γ	"	0,1	"	"
100 γ	"	0,1	"	"
75 γ	"	0,1	"	"
50 γ	"	0,1	"	"
25 γ	"	0,1	"	"
10 γ	"	0,1	"	"

Die nach 24 stündiger Bebrütung abgelesenen Hofdurchmesser sind in Abbildung 7 (S. 70) aufgezeichnet. Daraus ist ersichtlich, dass Proteus vulgaris, Staph. aur. SG 511 Jena und Escherichia coli gegen Gallussäure am anfälligsten sind, während Aerobacter aerogenes, Pseudomonas pyoceanea, Streptococcus pyogenes und Klebsiella pneumoniae wesentlich weniger gut und schliesslich Staph. aur. SG 511 Berlin, Staphylococcus albus, Streptococcus faecalis, Corynebacterium pseudodiphtheriticum und Diplococcus pneumoniae im Wachstum überhaupt nicht gehemmt wurden.

Zum weiteren Beweis dafür, dass ausschliesslich Gallussäure das in vitro antibakterielle Prinzip des Bärentraubenblättertees ist, wurden sämtliche Stämme noch einmal mit 0,1 ccm Teeabkochung (5,0 g Tee in 50 ccm Wasser) auf die beim vorigen Versuch beschriebene Art getestet. Die Ergebnisse stimmten qualitativ mit denen der vorigen Probe mit reiner Gallussäure überein, d.h. die Anfälligkeit der einzelnen Keime war in beiden Versuchen die gleiche.

Nach Abbildung 7 ist ersichtlich, dass zur wachstumshemmenden Wirkung der gegen Gallussäure empfindlichsten Keime Proteus vulgaris und Staph. aur. SG 511 Jena Konzentrationen reiner Gallussäure in einer konstanten Menge Lösungsmittel notwendig waren, die beim quantitativen Nachweis der Gallussäure im Harn (S. 58) nach oraler Ap-

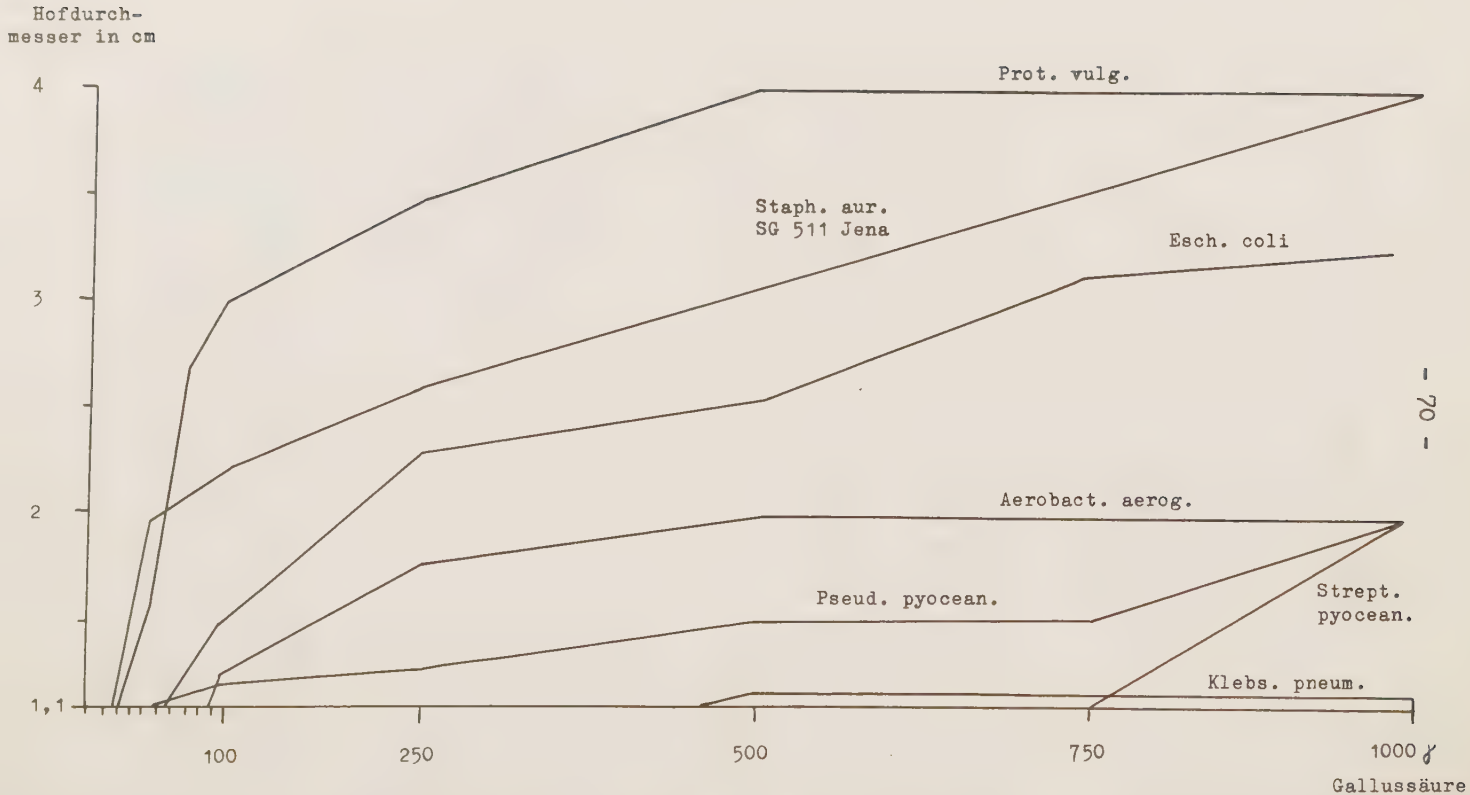


Abbildung 7

Wirkungsspektrum von Gallussäurelösungen gegenüber verschiedenen Keimen

plikation des Bärentraubenblättertees nicht auch nur annähernd erreicht werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse erschien es als wahrscheinlich, dass die bakteriostatische Wirksamkeit der Folia Uvae ursi bei Infektionen der Harnwege vermutlich nicht auf die genuin in den Blättern der Droge enthaltene Gallussäure zurückzuführen ist.

Eine endgültige Klärung dieser Frage konnte jedoch nur nach praktischen Versuchen am kranken menschlichen Organismus erzielt werden.

Gleichzeitig konnte durch die folgenden in-vivo-Versuche eine eventuelle Aufspaltung des Arbutins durch Bakterienfermente im Harn (Punkt 3 der Problemstellung S. 25) geprüft werden.

14. Untersuchungen der Wirksamkeit der Folia Uvae ursi am kranken menschlichen Organismus

Zehn Patienten und Patientinnen der Urologischen Abteilung des Westendkrankenhauses in Berlin wurden jeweils zwei Tage lang dreimal täglich eine halbstündige Abkochung von je 5,0 g Bärentraubenblättertee pro Tasse verabreicht. Voraussetzung bei der Auswahl der Versuchspersonen war, dass längere Zeit vorher keine Chemotherapeutika und Antibiotika gegeben worden waren. Es handelte sich bei den Patienten um Fälle, die wegen Nephrektomie, Nierenzysten, Harnleiter- und Nierensteinen eingeliefert worden waren.

Während der zweitägigen Verabreichung durften die Versuchspersonen keine anderen gerbstoffhaltigen Getränke zu sich nehmen.

Der pH der untersuchten Harne umfasste die Werte zwischen 5,4 und 8.

Der qualitative Keimgehalt der Urine war für jeden

Patienten verschieden. Die Bestimmung war vom Medizinaluntersuchungsamt II Berlin durchgeführt worden. Insgesamt handelte es sich um folgende Keime: Staphylococcus albus, Proteus vulgaris, Escherichia coli, Aerobacter aerogenes und Staphylococcus aureus.

Von dem vor Eingabe des Bärentraubenblättertees durch Katheter entnommenen Harn jedes einzelnen Patienten wurden mit Kochsalzlösung fortlaufende Verdünnungen im Verhältnis 1 : 1 hergestellt und von jeder Verdünnung 0,1 ccm auf einer Agarplatte ausgespatelt. Nach der eintägigen Bebrütung war auf den einzelnen Platten im Verhältnis der fortlaufenden Verdünnungen der ausgespatelten Harne eine geringere Keimzahl pro Platte erkennbar. Für jeden Patienten wurde die Verdünnung, bei der 150 bis 300 Keime auf dem Agar gewachsen waren, festgestellt und bei den anschliessenden Versuchen wiederhergestellt, so dass bei gleichen Versuchsbedingungen eine eventuelle Abnahme der Keimzahl nach der Eingabe des Tees durch vergleichende Keimzahlbestimmungen festgestellt werden konnte.

Nach Beginn der Eingaben wurden vom 1. Tages-, 1. Nacht-, 2. Tages- und 2. Nachtharn die im Vorversuch hergestellten Verdünnungen, bei denen 150 bis 300 Keime pro Platte gewachsen waren, wiederholt, wiederum je 0,1 ccm Verdünnung pro Agarplatte ausgespatelt und nach dem Bebrüten die Keime ausgezählt. Dabei wurde festgestellt, dass in keinem Falle eine wesentliche Reduzierung der Keimzahlen stattgefunden hatte, sondern dass die Werte bei denselben Patienten z.T. unter, z.T. aber auch wesentlich höher als bei dem vor der Eingabe durchgeführten Blindversuch lagen. Da jedoch von einer antibakteriellen Wirksamkeit eines Stoffes erst gesprochen werden kann, wenn mindestens eine 90 %ige Verminderung bzw. ein völliges Fehlen von Keimen vorliegt, war also das Ergebnis dieses Versuchs als negativ anzusehen.

Besonders zu erwähnen ist, dass bei drei Fällen mit alkalischem Harn nur in einem eine Verfärbung des Harns

nach der Eingabe des Bärentraubenblättertees nach rotbraun stattgefunden hatte und dass auch hier keine Verminderung der Keimzahl erfolgt war.

Es blieb nun nur übrig, noch festzustellen, ob nach der Eingabe einer Abkochung der Folia Uvae ursi überhaupt ein antiseptisches bzw. antibakteriell wirksames Prinzip festgestellt werden konnte, das vielleicht nur unter besonderen Umständen wirkte, z.B. bei stärkerer Konzentration des wirksamen Stoffes bei gleichzeitig geringerer Flüssigkeitsaufnahme.

Zu diesem Zweck wurden drei Patienten mit unterschiedlichem pH (5,6; 7; 8) des Harns vormittags, mittags und nachmittags zwei Tage lang eine Abkochung von jeweils 5,0 g Bärentraubenblättertee pro Tasse verabreicht und der Urin 2 - 3 Stunden nach jeder Einnahme quantitativ aufgefangen. Jede einzelne Fraktion wurde 1/2 Stunde nach der Entnahme fünfmal mit je 200 ccm Essigester jeweils fünf Minuten lang ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen mit Natr. sulf. sicc. und Filtrieren wurde der Essigester sofort abdestilliert. Der gesamte pro Patient hinterbleibende Harnrückstand wurde jeweils auf ein angefeuchtetes Filterpapier gewischt und dieses auf beimpfte Agarschalen gelegt. Nach der 24 stündigen Bebrütung hätten infolge der zu erwartenden hohen Konzentration des bakteriostatisch wirksamen Stoffes beachtliche Hemmhöfe entstanden sein müssen. Die tatsächlichen Höfe betrugen jedoch nur 1,5 bis 1,8 cm Ø. Nach einer Lösung der Rückstände in 10 ccm Wasser und Auftropfen von 0,1 ccm Lösung auf beimpfte Agarschalen traten überhaupt keine Höfe mehr auf.

Da selbst diese Konzentration (Gesamtrückstand des Harns nach einer einmaligen Gabe von Bärentraubenblättertee, gelöst in 10 ccm Wasser) der wirksamen Gallussäure offensichtlich zu gering war, um eine Wirkung entfalten zu können, war ein therapeutischer Erfolg der Droge im Urin bei weiterer 20- bis 30facher Verdünnung nicht zu erwarten.

G. Diskussion

Als Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit stand die Überlegung, dass entgegen den Berichten in der Fachliteratur das in den Bärentraubenblättern enthaltene Glykosid Arbutin durch eine saure oder alkalische pH-Verschiebung nicht in Glukose und bakteriostatisch wirksames Hydrochinon gespalten werden kann und dass auch eine therapeutische Wirkung der Droge durch eine fermentative Spaltung des Arbutins durch in den Blättern der Bärentraube enthaltene ß-Glykosidase infolge Paarung an Glucuronsäure und Ausscheidung als ungiftiges Glucuronid nicht in Frage kommen kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob eine fermentative Spaltung des Glykosids durch Bakterienfermente im Harn durchgeführt werden kann oder ob in den Folia Uvae ursi ein bakteriostatischer Inhaltsstoff enthalten ist, der nicht mit dem Hydrochinon identisch ist.

Zu Beginn wurde in vitro eine antibakterielle Wirkung einer wässrigen Abkochung von Folia Uvae ursi gegenüber Staph. aur. SG 511 Jena festgestellt. Da dieser Bakterienstamm ausgezeichnet auf den Wirkstoff ansprach, d.h. sich grosse und gut ablesbare Hemmhöfe zeigten, wurde er für sämtliche Versuche, die sich mit der Isolierung des wirksamen Prinzips befassten, verwendet.

Zur Klärung der Frage, ob das Arbutin identisch mit dem in vitro antibakteriellen Prinzip ist und inwieweit das Glykosid überhaupt eine keimhemmende Wirkung entfaltet, wurde es nach den Verfahren von Hager[52] und Winterfeld[53] aus den Blättern der Erikazee gewonnen. Dabei wurde jede einzelne Fraktion der Darstellungsverfahren auf das weitere Vorhandensein der in vitro bakteriostatisch wirksamen Substanz geprüft. In beiden Fäl-

len wurde sie vor der Endisolierung des Arbutins ausgeschieden.

Versuche mit reinem Arbutin zeigten auch bei unterschiedlichem pH der Lösungen und 24 stündiger Erwärmung auf 37° C keine antibakterielle Wirksamkeit. Hydrochinon war chemisch nicht nachzuweisen.

Bei der Isolierung der in vitro bakteriostatisch wirksamen Substanz wurde das Prinzip der wässrigen Extraktion beibehalten, zumal in der Praxis der Tee als wässrige Lösung eingenommen wird.

Nach mehrmaligem Auszug durch Kochen des Teepulvers mit Wasser wurde der Extrakt eingedickt, mit Methanol aufgenommen und mehrere Male am Rückflusskühler gekocht. Nach Abfiltration und Eindampfen der Lösung wurde der Rückstand auf seine Wirksamkeit gegen Staph. aur. geprüft. Da das Ergebnis positiv war, d.h. Hemmhöfe zu erkennen waren, wurde eine weitere Einengung des gesuchten Stoffes durch Ätherextraktion durchgeführt. Hierbei erwies sich die Ausschüttelmethode aus wässriger Lösung am geeignetsten. Eine Probe des Ätherauszugs nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels zeigte wiederum grosse Hemmhöfe.

Eine wesentliche Reinigung des Rückstands durch die Säulenchromatographie mit saurem Aluminiumoxyd gelang nicht.

Mittels papierchromatographischer Versuche konnte ein unter kurzwelligem UV-Licht violett gefärbter Fleck identifiziert werden, der nach Auflegen auf eine mit Staph. aur. beimpfte Agarplatte einen deutlichen Hemmhof nach der Bebrütung der Platte zeigte. Infolge typischer Farbreaktionen dieses Fleckes nach Besprühen mit Reagenzlösungen (Eisenchlorid- und Echtblau-B-Lösung Merck) wurde angenommen, dass es sich bei der gesuchten Substanz um einen phenolischen Körper handelt.

Ein papierchromatographischer Vergleich zwischen dieser bakteriostatisch wirksamen Substanz und Arbutin und Hydrochinon zeigte nochmals, dass der unbekannte Fleck nicht mit einem der beiden bekannten Stoffe identisch ist.

Säulenchromatographische Versuche mit dem Versuchsprodukt PP 15 Sp der Badischen Anilin- und Sodafabrik zeigten eine gute Trennungsmöglichkeit des Ätherextraktes. Der Wirkstoff konnte durch Wassereluationen in allerdings verunreinigtem Zustand gewonnen werden.

Eine chemische und physikalische Reinigung des Eluats durch Umkristallisation bzw. Ausschütteln mit Kohle, Bolus alba und Talcum gelang nicht.

Ein Sublimationsversuch des Eluatrückstands zeigte im Staphylokokken-Plattenversuch einen grossen bakterienfreien Hof des Sublimats. Nach Reinigung durch Umkristallisation aus Xylol konnte mittels Schmelzpunktes, chemischer Identitätsreaktionen und papierchromatographischer Vergleiche die Identität mit Pyrogallol bestimmt werden.

Mit Hilfe der Papierchromatographie wurde festgestellt, dass es sich bei Pyrogallol um einen Stoff handelt, der nicht genuin in den Bärentraubenblättern vorkommt, vielmehr erst durch die Sublimation entstanden war. Da Pyrogallol technisch aus Gallussäure gewonnen wird, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem in vitro antibakteriell wirksamen Stoff um Gallussäure handelt. Durch papierchromatographische Vergleiche mit reiner Gallussäure und chemische Identitätsreaktionen wurde diese Vermutung als richtig nachgewiesen.

Da nach Methanolextraktionen der Folia Uvae ursi aufgefallen war, dass nach Entwicklung von Chromatogrammen ausser der Gallussäure noch ein anderer Fleck gegen Staph. aur. wirkte, bestand die Notwendigkeit der Identifizierung dieser Substanz. Hierbei wurde von der theo-

retischen Überlegung ausgegangen, dass das als Inhaltsstoff der Bärentraubenblätter bekannte Tannin z.T. ebenfalls aus Gallussäure besteht.

Nach Hydrolyse des Tees konnte papierchromatographisch festgestellt werden, dass der vor der Hydrolyse erhaltene wirksame Fleck seine bakterienhemmende Wirkung verloren und die Konzentration des Gallussäurefleckes zugenommen hatte. Da kein anderer Fleck des Chromatogramms nach der Hydrolyse eine bakteriostatische Wirkung ausübte, war eindeutig bewiesen, dass als alleiniger in vitro wirksamer Stoff der Folia Uvae ursi die Gallussäure in Betracht kam.

Untersuchungen anderer Autoren[57-62] hatten ergeben, dass nach oraler Applikation von Gallussäure diese im Harn nachgewiesen werden konnte; nach Einnahme von Tannin war nach ihren Angaben ebenfalls Gallussäure nachweisbar. Im Kaninchen- und Selbstversuch konnten diese Aussagen nach Eingabe von Gallussäure (Tannin wurde nicht geprüft) bestätigt werden.

Im Selbstversuch musste nun geklärt werden, ob nach Einnahme von Bärentraubenblättertee Gallussäure im Harn nachgewiesen werden kann und wie gross die Konzentration im ausgeschiedenen Harn ist.

Nach Einnahme des Tees konnte Gallussäure papierchromatographisch im Harn nachgewiesen werden. Durch Vergleich mit verschieden konzentrierten Blindlösungen konnte auf Grund der Farbintensität nach Besprühen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung eine Gallussäurekonzentration von ungefähr 0,01 °/oo im Urin ermittelt werden.

Eine Gehaltsbestimmung von Gallussäure in verschiedenen Teesorten mit Hilfe der UV-Absorption zeigte das Vorhandensein von 0,5 bis 1,5 % freier Säure und 1,6 bis 6 % Gesamtsäure nach Hydrolyse in den Bärentraubenblättern.

Da der Prozentgehalt an Gallussäure der im Selbstversuch verwendeten Droge mit am höchsten war, konnte der im Urin ermittelte Wert von 0,01 °/oo als guter Durchschnitt angesehen werden.

Es wurde ein Wirkungsspektrum von Gallussäurelösungen mit verschiedenen Konzentrationen gegen 12 Bakterienstämme aufgestellt. Dabei zeigte es sich, dass Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus SG 511 Jena und Escherichia coli am anfälligsten gegen Gallussäure waren, während die anderen Keime weniger gut oder gar nicht bei bestimmten Konzentrationen in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Die Mindestmenge an Säure, die bei diesen Versuchen ein Wachstum gerade noch verhinderte, betrug auch für die gegen Gallussäure am anfälligsten Keime Prot. vulg. und Staph. aur. SG 511 Jena ein Vielfaches der im Harn nachgewiesenen Menge an Säure, so dass trotz der relativ ungenauen Messmethoden der Diffusionsteste mit grosser Wahrscheinlichkeit gesagt werden konnte, dass der in den Bärentraubenblättern genuin enthaltenen Gallussäure bei den in der Praxis verwendeten Dosen keine therapeutische Wirkung in bakteriostatischer Hinsicht zukommt.

Ein endgültiger Beweis hierzu sowie zur Frage der fermentativen Spaltung des Arbutins durch Bakterienfermente konnte jedoch erst nach praktischen Versuchen am kranken Menschen erbracht werden. Bei 10 Patienten bzw. Patientinnen der Urologischen Abteilung des Westendkrankenhauses in Berlin wurde bei bekanntem qualitativen Keimgehalt durch Zugabe von Kochsalzlösung die Verdünnung ermittelt, bei der pro Patient und Platte 150 bis 300 Keime wuchsen. Während und nach zweitägiger Verabreichung von Bärentraubenblättertee konnte nach Herstellung gleicher Verdünnungen keine Reduzierung der Zahl der Bakterien festgestellt werden. Nach Essigesterausschüttelungen der Harne dieser Patienten wurde die Wirksamkeit der

Rückstände nach Abdestillieren des Lösungsmittels gegen Staph. aur. geprüft. Es ergaben sich minimale Hemmhöfe von ca. 1,5 cm Ø bei einem Durchmesser von 1,4 cm des Blättchens. Nach Lösung des Rückstands in 10 ccm Wasser liess sich jedoch infolge zu geringer Konzentration eine bakteriostatische Wirkung gegen den gleichen Keim nicht mehr feststellen, so dass also bei weiterer zwanzigfacher Verdünnung, wie sie im menschlichen Körper vorhanden ist, keine antibakterielle Wirkung der Folia Uvae ursi auftreten kann.

Die Versuche hatten also eindeutig bewiesen, dass

1) die Gallussäurekonzentration des Bärentraubenblättertees nicht ausreicht, um eine bakterienhemmende Wirkung im menschlichen Organismus zu entfalten, dass

2) in vitro und in vivo kein anderer bakteriostatisch wirksamer Stoff in den Folia Uvae ursi enthalten ist, und dass

3) eine therapeutische Wirkung des Bärentraubenblättertees infolge Spaltung des Arbutins in Glukose und Hydrochinon durch Bakterienfermente nicht in Frage kam.

V. Zusammenfassung

1. Eine in vitro antibakterielle Wirksamkeit von Pflanzenextrakten verschiedener Begoniazeen wurde in vorher noch nicht untersuchten Begonia semperflorens-Arten festgestellt. Die nach Extraktion mit Methanol und Azeton anfallenden Kristalle, denen eine bakteriostatische Wirkung zugeschrieben werden konnte, wurden chemisch und papierchromatographisch als Oxalsäure identifiziert.

2. In vitro konnte eine antibakterielle Wirkung der Folia Uvae ursi nachgewiesen werden, die nicht auf dem Vorhandensein des hypothetischen Wirkstoffes Arbutin bzw. einer Spaltung dieses Glykosids beruht.

   Durch papierchromatographische Versuche konnte der R_F-Wert der unbekannten Substanz bestimmt und durch säulenchromatographische Untersuchungen eine weitgehende Reinigung des bakteriostatischen Prinzips erreicht werden. Mit Hilfe von chemischen und papierchromatographischen Vergleichsmethoden wurde der gesuchte Stoff als Gallussäure bestimmt.

   Im Selbstversuch wurde Gallussäure nach oraler Applikation von reiner Substanz und von Bärentraubenblättertee im Harn qualitativ und im letzten Fall auch quantitativ nachgewiesen.

   In einem quantitativen Vergleich mehrerer Sorten des Tees wurde die durchschnittliche Gallussäurekonzentration in reiner und in an Tannin gebundener Form ermittelt.

   In einem Breitenspektrum wurde die Wirksamkeit der Gallussäure in Abhängigkeit von der Konzentration gegenüber verschiedenen Keimen in vitro gezeigt.

   Die hierbei ermittelten notwendigen Konzentrationen der Gallussäure als Bakteriostatikum wurden im Ver-

gleich zu dem im Selbstversuch nach Einnahme von Bärentraubenblättertee festgestellten quantitativen Wert wesentlich überschritten, so dass eine antibakterielle Wirkung der Gallussäure im Tee als ausgeschlossen erscheinen musste.

Der endgültige Beweis dieser Annahme wurde nach Verabreichung der Folia Uvae ursi an mehrere Krankenhauspatienten erbracht, indem eine Keimzahlverminderung durch die Eingabe nicht festgestellt werden konnte.

Da die Keimzahl nicht vermindert wurde, kam auch eine fermentative Spaltung des Arbutins durch Bakterienenzyme im Harn nicht in Betracht.

VI. Literaturverzeichnis

1) OSBORN, E. M.: On the Occurance of Antibacterial Substances in Green Plants.
Brit. J. Exper. Path. 24, 227 (1943)

2) ATKINSON, N.: Antibacterial Substances from Flowering Plants. 3. Antibacterial Activity of Dried Australian Plants by a Rapid Direct Plate Test.
Austral. J. Exp. Biol., 34, 17 (1956)

3) FREERKSEN, E. und BÖNICKE, R.: Über antibakterielle Prinzipien in höheren Pflanzen.
Zeitschr. f. Hygiene, 132, 417 (1951)

4) NISHIKAWA, H.: Versuche, antib. Wirk. von Pflanzenextr. zu finden.
Japan. J. Exp. Med. 20, 337 (1949)
nach 22).

5) AGOSTIMUCCI, G. und ANZALONE, D.: Ricerche sul potere antimicrobico di estatte di fiori italiani.
Nuov. Ann. Ig. Microbiol. Ital. 3, 173 (1952)
nach 9).

6) TANABE, ST. und NISHIKAWA, H.: Prüfung von Pflanzenauszügen auf antibiotische Wirkung.
Jap. J. Bacteriol. 9, 475 (1954)
Ref. Chem. Zbl. 126, 11020 (1955)

7) FRISHBEY, A.; ROBERTS, J. M.; JENNINGS, J. C.; GOTTSHALL, R. Y. und LUCAS, E. H.: The Occurence of Antibacterial Substances in Seed Plants with Special Reference to Myobacterium tuberculosis.
Ref. Chem. Zbl. 128, 9415 (1957)

8) WINTER, A. G. und WILLEKE, L.: Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen.
Naturwissensch. 38, 262 (1951); 38, 354 (1951); 38, 475 (1951); 39, 45 (1952); 39, 190 (1952); 39, 236 (1952); 40, 167 (1953)

9) DUQUENOIS, P.: Les antibiotiques des plantes supérieures.
Bull. Soc. Bot. France 102, 377 (1955)

10) SKINNER, F. A.: Antibiotics.
In "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", PAECH, TRACEY, Bd. III, Springer-Verlag Berlin 626 ff. (1955)

11) KORZYBSKI, T. und KURYLOWICZ, W.: Antibiotica.
Fischer-Verlag, Jena 973 ff. (1961)

12) HERRELL, W. E.: Penicillin und andere Antibiotica.
Hirzel Verlag, Stuttgart S. 1 (1949)

13) FLEMING, A.: Penicillin und seine praktische Anwendung.
Thomas-Verlag, Kempen/Niederrh. S. 9 (1950)

14) KLOSA, J.: Antibiotika.
Verlag Technik, Berlin S. 10 (1952)

15) PRATT, R. und DUFRENOY, J.: Antibiotics.
J. B. Lippincoll Company, Philadelphia S. 201 (1949)

16) VOGEL, H.: Die Antibiotica.
Hans Carl Verlag, Nürnberg, S. 23 (1951)

17) VONDERBANK, H. und ERDMANN, W. F.: Zur Definition des Antibiotikum-Begriffes.
Arz. Forsch. 4, 136 ff (1954)

18) CZETSCH-LINDENWALD, H.: Phytoantibiotika.
Scient. Pharm. 23, 243 (1955)

19) TOKIN, B. P.: Phytonzide.
Verlag Volk und Gesundheit, Berlin S. 16 (1956)

20) BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology, 7. Aufl., The William & Wilkins Company (1957)

21) ROSSBERG, K. A.: Experimentelle Untersuchungen über Antibiotika (Phytonzide) aus höheren tropisch-subtropischen Pflanzen.
Inaugural-Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin (1958)

22) SCHUBNELL, E. W.: Experimenteller Beitrag zur Kenntnis eines in verschiedenen Begonia-Arten enthaltenen antibakteriellen Prinzips. Inaugural-Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin (1958)

23) TOSCHKOV, A. und SCHEIKOVA, G.: Bacterizidnoto diestvie na listata na neikoizwete. Sbornik Trudove Dardj. Ysat. "Nauka i iskustwo", Tom III, Sofia (1956)

24) MOLISCH, H.: Mikrochemie der Pflanze. Fischer-Verlag, Jena S. 111 (1923)

25) HAIS, I. M. und MACEK, K.: Handbuch der Papierchromatographie Bd. I Fischer-Verlag, Jena S. 252 (1958)

26) HOPPE, H.: Drogenkunde. Verlag Cram, de Cruyter & Co, Hamburg S. 93 (1958)

27) BERGER, F.: Handbuch der Drogenkunde Bd. II Maudrich Verlag, Wien S. 356 (1959)

28) JARETZKY, R. und GEITH, K.: Die deutschen Heilpflanzen in Bild und Wort. Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart S. 26 (1954)

29) KROEBER, L.: Das neuzeitliche Kräuterbuch Bd. I Hippokrates Verlag, Stuttgart S. 52 (1948)

30) FLÜCKIGER, F. H.: Pharmakognosie des Pflanzenreichs. Gartners Verlagsbuchhandlung, Berlin S. 661 (1891)

31) ZÖRNIG, H.: Arzneidrogen, 1. Teil. Verlag Werner Klinkhardt, Leipzig S. 181 (1909)

32) DIENER, H.: Drogenkunde. Fachbuchverlag, Leipzig S. 111 (1958)

33) MEYER, E.: Taschenbuch der pflanzlichen Therapie Bd. I Haug Verlag, Saulgau S. 166 (1952)

34) MEYER, ERNST: Taschenbuch der pflanzlichen Therapie
Bd. I
Haug Verlag, Saulgau S. 185 (1952)
35) v. WIESNER, J.: Die Rohstoffe des Pflanzenreichs.
W. Engelmann Verlag, Leipzig S. 514 (1921)
36) ROTHGANG, H.: Spezialitäten-Praktikum.
J. F. Lehmann Verlag, München S. 1030 ff.
(1961)
37) JARETZKY, R.: Lehrbuch der Pharmakognosie.
Verlag Vieweg & Sohn, Braunschweig
S. 85 (1949)
38) HEGI, G.: Alpenflora.
Carl Hauser Verlag, München S. 57 (1956)
39) Kommentar zur Pharmacopoea Helvetica.
Zürich S. 422 (1947)
40) KUHN und SCHÄFER:
Scient. Pharm. 10, 47 (1939)
nach 39)
41) Remington's Practice of Pharmacie 8. Aufl.
Lippincott Company, Philadelphia
S. 1184 (1942)
42) KAWALIER, A.: Über die Blätter von Arctostaphylos
uva ursi.
Annalen der Chemie und Pharmacie, Heidelberg
82, 243 (1852)
43) WINKELMANN, W.: Die Wirkstoffe unserer Heilpflanzen.
Verlag Otto Walter AG. Olten S. 180 (1951)
44) KLOSA, J.: Entwicklung und Chemie der Heilmittel
Bd. III. Verlag Technik, Berlin
S. 168 (1952)
45) MUNK, FRITZ: Organon für die praktische Arzneiheil-
kunde.
F. Enke Verlag, Stuttgart S. 358 (1951)
46) ENGE, W.: Gerbstoffe.
Referat Pharmazeutische Ztg. 19, 569 (1961)
47) EICHHOLTZ, F.: Lehrbuch der Pharmakologie.
S. 531 (1957)

48) WEISS, R. F.: Lehrbuch der Phytotherapie.
Hippokrates Verlag, Stuttgart S. 278 (1960)

49) HALLMANN, L.: Bakteriologie und Serologie
G. Thieme Verlag, Stuttgart
S. 52 (1955)

50) WINTER, A. G. und HORNBOSTEL, M.: Untersuchungen über den antibakteriellen Effekt von Spaltprodukten des Arbutins in den abführenden Harnwegen.
Naturwissenschaften, 13, 379 (1957)

51) WINTER, A. G. und WILLEKE, L.: Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen.
Hemmstoffe im herbstlichen Laub.
%. Mittlg. Naturwissenschaften, 2, 46 (1952)

52) HAGERs Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Bd. I
Springer-Verlag, Berlin S. 522 (1925)

53) WINTERFELD, K.: Praktikum der organisch-präparativen pharmazeutischen Chemie.
Steinkopf Verlag, Dresden S. 228 (1950)

54) PEYER in Jahresbericht Caesar & Loretz AG.
Halle/Saale S. 69 (1924)

55) Chromatographie.
E. Merck AG., Darmstadt S. 136 Nr. 6

56) HERMANN, K.: Über den Gerbstoffgehalt der Bärentraubenblätter.
Arch. d. Pharm. 286, 517 (1953)

57) BLUMENBERG, F.-W. und DOHRMANN, R.: Über den Ausscheidungsmechanismus oral zugeführter Gallussäure.
Arzneimittel-Forschung 10, 109 (1960)

58) LILJESTRAND, G.: Poulssen's Lehrbuch der Pharmakologie.
Hirzel Verlag, Leipzig S. 316 (1945)

59) HESSE, E.: Angewandte Pharmakologie.
Verlag Urban & Schwarzenberg, Berlin
S. 27 (1947)

60) MØLLER, K.: Pharmakologie.
Benno Schwabe Verlag, Basel S. 166 (1953)
61) DIXON, W. E.: A Manual of Pharmacology.
Edward Arnold, London S. 263 - 264 (1906)
62) SOLLMANN, T.: A Manual of Pharmacology and its
Applications to Therapeutics and Toxicology.
W. B. Saunders Company, Philadelphia
S. 135 (1953)
63) CRAMER, F.: Papierchromatographie.
Verlag Chemie, Weinheim S. 63 (1958)
64) WALTER, A. M. und HEILMEYER, L.: Antibiotika-Fibel.
Thieme Verlag, Stuttgart S. 544 (1954)

Lebenslauf

Am 23. Juli 1930 wurde ich als Sohn des Oberinspektors Wilhelm Schütz und seiner Ehefrau Jutta, geb. Conradi, in Berlin-Dahlem geboren.

Im Jahre 1936 wurde ich in die 1. Volksschule Berlin-Steglitz eingeschult, und ab 1940 besuchte ich die dortige Wrangel-Oberschule. 1942 zogen meine Eltern und ich nach Bad Wilsnack, wo ich im Jahre 1949 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1949 bis 1950 studierte ich an der Brandenburgischen Landeshochschule in Potsdam und daran anschliessend vier Semester an der Pädagogischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin Anglistik und Slawistik.

Im Jahre 1953 siedelte ich von Ost- nach Westberlin über und trat als Praktikant in die Charlotten-Apotheke in Berlin-Spandau ein. Nach bestandenem Vorexamen wurde ich 1955 an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert, an der ich 1958 das pharmazeutische Staatsexamen bestand.

Nach einjähriger Kandidatenzeit in der Alten Roland-Apotheke in Berlin erhielt ich 1959 die Bestallung als Apotheker.

Seit dem Jahre 1959 befasste ich mich mit der vorliegenden Arbeit unter der Leitung von Herrn Professor Dr. B.Schmidt, Direktor des Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie und unter Leitung von Herrn Professor Dr. R.Hänsel, Direktor des Instituts für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin.

Druck: Arno Brynda, Berlin W 30